



ULPGC
Universidad de
Las Palmas de
Gran Canaria

Instituto Universitario de
Sanidad Animal
y Seguridad Alimentaria



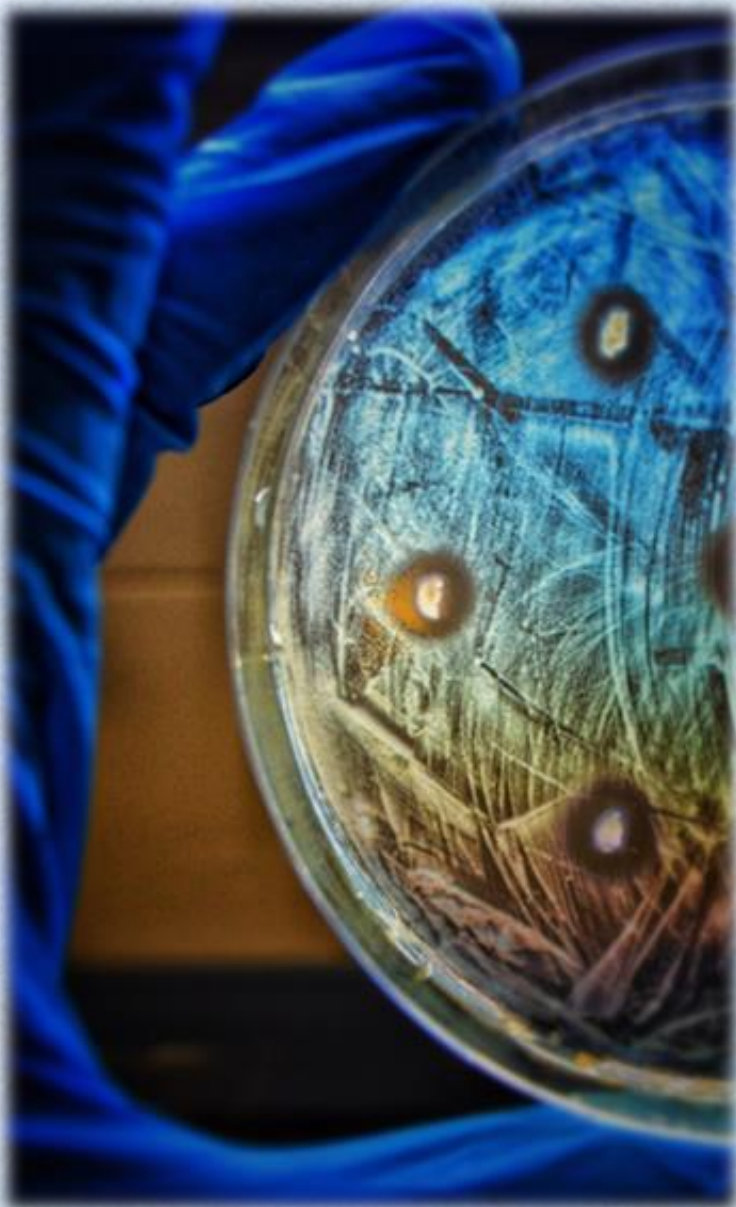
TESIS DOCTORAL

NUEVAS CEPAS PROBIÓTICAS PARA ACUICULTURA

Ana Isabel Gutiérrez Falcón

DOCTORADO EN SANIDAD
ANIMAL Y SEGURIDAD
ALIMENTARIA

2021





ULPGC

**Universidad de
Las Palmas de
Gran Canaria**

**Instituto Universitario de
Sanidad Animal
y Seguridad Alimentaria**



Tesis Doctoral:

**NUEVAS CEPAS PROBIÓTICAS PARA
ACUICULTURA**

Programa de doctorado:

Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

Ana Isabel Gutiérrez Falcón

Arucas, 2021

A mis padres...

"Aprendí que el coraje no es la ausencia de miedo,
sino el triunfo sobre él"

- **Nelson Mandela**

"Es mejor saber después de haber pensado y
discutido que aceptar los saberes que nadie discute
para no tener que pensar"

- **Fernando Savater**

A decorative graphic at the top of the page consisting of a blue, textured splash or wave pattern that tapers off towards the right. The colors range from light blue to a darker, more saturated blue.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ABREVIATURAS.....	VI
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	5
II.1.- OBJETIVO GENERAL	5
II.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
III.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
III.1- IMPORTANCIA DE LA ACUICULTURA.....	6
III.1.1- LA ACUICULTURA EN EL MUNDO	6
III.1.2- LA ACUICULTURA EN LA UNIÓN EUROPEA.....	10
III.1.3- LA ACUICULTURA EN ESPAÑA	12
III.1.4- LA ACUICULTURA EN CANARIAS.....	15
III.2 ENFERMEDADES BACTERIANAS OBJETO DE ESTUDIO DEL PRESENTE TRABAJO.....	17
PASTEURELOSIS.....	17
VIBRIOSIS.....	18
ESTREPTOCOCIAS	20
ENFERMEDAD DE LA BOCA ROJA.....	21
FORUNCULOSIS.....	22
III.3 CONTROL DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS.....	22
III.3.1.- ANTIBIÓTICOS	22
III.3.2.- VACUNACIÓN	24
III.3.3.- INMUNOESTIMULANTES.....	26
III.3.4.- PROBIÓTICOS.....	27
III.4.- SISTEMA INMUNE EN TELEÓSTEOS	51
III.4.1. CITOQUINAS.....	52
III.5.- SEPSIS Y RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS	55
IV.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	57

IV.1.-AISLAMIENTO DE CEPAS PROBIÓTICAS.....	57
IV.2.- SELECCIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS	58
IV.2.1.-MECANISMOS DE ACCIÓN IN VITRO.....	58
IV.2.2.- IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS	64
IV.2.3.- ENSAYOS IN VIVO.....	65
IV.3.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO EXPERIENCIAS PECES.....	71
IV.4 EXPERIENCIA: PROTECCIÓN FRENTE A PERITONITIS FECALOIDE .	71
IV.4.1.- ALOJAMIENTO DE LOS ANIMALES.....	71
IV.4.2.- INOCUIDAD Y COLONIZACIÓN	72
IV.4.3- PROTECCIÓN FRENTE A LA PERITONITIS FECALOIDE EN RATAS.....	73
IV.4.4.- TEMPERATURA CORPORAL, PESO Y RECOGIDA DE MUESTRAS.	75
IV.4.5.- HEMOGRAMA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA	75
IV.4.6.- RECUENTOS BACTERIANOS EN HECES	76
IV.4.7.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO (ORINA, SANGRE Y LAVADO BRONCOALVEOLAR:	77
IV.4.8.- EVALUACIÓN HISTOLÓGICA.....	78
IV.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO EXPERIENCIAS CON RATAS	79
V.- RESULTADOS.....	80
V.1.- CEPAS OBTENIDAS EN LOS MUESTREOS	80
V.2.-RESULTADOS DE LAS PRUEBAS IN VITRO DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS PRESELECCIONADAS.....	81
V.2.1.- INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE PATÓGENOS DE INTERÉS EN ACUICULTURA	81
V.2.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS PRESELECCIONADAS	84
V.2.3.- PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS ANTIBACTERIANAS	85
V.2.4.- RESISTENCIA A GRADIENTES DE PH	85
V.2.5.- RESISTENCIA A LA BILIS.....	87
V.2.6.- COMPETICIÓN POR NUTRIENTES MEDIANTE CO-CULTIVO ...	88
V.2.7.- HIDROFOBICIDAD CELULAR.....	90
V.2.8.- ADHESIÓN AL MUCUS INTESTINAL Y CUTÁNEO.....	91

V.2.9.- CRECIMIENTO EN MUCUS INTESTINAL Y CUTÁNEO.....	93
V.4.- ENSAYOS IN VIVO	95
V.4.1.- INOCUIDAD DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS PRESELECCIONADAS	95
V.4.2.- CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.	95
V.5.- EXPERIENCIA DE PERITONITIS FECALOIDE EN RATAS	117
V.5.1.- INOCUIDAD	117
V.5.2.- CONDICIONES DE COLONIZACIÓN INTESTINAL	118
V.5.3.- ACTIVIDAD PROBIÓTICA CONTRA LA INFECCIÓN	120
VI.-DISCUSIÓN.....	124
VII.-CONCLUSIONES.....	137
VIII.-RESUMEN.....	138
IX.-SUMMARY.....	141
X.- BIBLIOGRAFÍA.....	140
XI.- AGRADECIMIENTOS.....	194
XII.- PUBLICACIONES.....	198

A decorative graphic at the top of the page featuring a blue, textured splash or wave pattern that tapers off towards the right. The text is centered within this graphic.

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.- Principales países productores para la acuicultura por toneladas anuales en 2018 y tasa de variación interanual (APROMAR, 2020).	7
Tabla II.- Principales especies por valor (millones de euros) producidas mediante acuicultura en el mundo en 2018 y variación interanual (APROMAR, 2020).	9
Tabla III.- Principales especies producidas en acuicultura en la Unión Europea, por toneladas, en el año 2018 (APROMAR, 2020).	11
Tabla IV.- Probióticos utilizados en peces.	44
Tabla V.- Cepas patógenas en acuicultura utilizadas en la experiencia de inhibición del crecimiento de las cepas aisladas como posibles cepas probióticas.	59
Tabla VI.- Secuencias de cebadores utilizados para la qPCR Y T ^a de hibridación.....	69
Tabla VII.- Protocolo de ciclos de qPCR para expresión de los genes.....	70
Tabla VIII.- Puntuación de la prueba de protección contra roedores.	74
Tabla IX.- Puntuación histopatológica de la peritonitis.....	79
Tabla X.- Fuente de las cepas preseleccionadas como posibles cepas probióticas.	80
Tabla XI.- Inhibición del crecimiento frente a diferentes patógenos para la acuicultura.	82
Tabla XII.- Identificación de las cepas potencialmente probióticas mediante MALDI-TOF.....	84
Tabla XIII.- Identificación de la cepa A12C mediante secuenciación parcial del gen 16S por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).....	85
Tabla XIV.- Porcentaje de supervivencia ($\bar{X} \pm s$), de las cepas seleccionadas como potenciales cepas probióticas en diferentes valores de pH 3-7.....	87
Tabla XV.- Porcentaje de supervivencia en bilis de lubina ($\bar{X} \pm s$) de las cepas seleccionadas como potenciales cepas probióticas.....	88

Tabla XVI.- Efecto de las cepas probiótica sobre el crecimiento de diferentes cepas patógenas del género <i>Vibrio</i> seleccionadas en co-cultivo.....	89
Tabla XVII.- Porcentaje de hidrofobicidad ($\bar{X} \pm s$) de las 12 cepas probióticas preseleccionadas.....	90
Tabla XVIII.- Porcentaje de adhesión ($\bar{X} \pm s$) de las doce cepas preseleccionadas al mucus cutáneo e intestinal de lubina.....	92
Tabla XIX.- Crecimiento de las 12 cepas probióticas en mucus intestinal y cutáneo de lubina, (expresado en UFC/ml) tras 22 h de incubación.....	94
Tabla XX.- Valores de expresión de IL-1 β en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales con las cepas <i>Alcaligenes faecalis</i> subp. <i>faecalis</i> -1 y <i>Vagococcus fluvialis</i> L21.....	97
Tabla XXI.- Valores de expresión de IL-6 en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales con las cepas <i>Alcaligenes faecalis</i> subp. <i>faecalis</i> -1 y <i>Vagococcus fluvialis</i> L21.....	100
Tabla XXII.- Valores de expresión de IL-10 en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales con las cepas <i>Alcaligenes faecalis</i> subp. <i>faecalis</i> -1 y <i>Vagococcus fluvialis</i> L21.....	103
Tabla XXIII.- Valores de expresión de COX-2 en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales con las cepas <i>Alcaligenes faecalis</i> subp. <i>faecalis</i> -1 y <i>Vagococcus fluvialis</i> L21.....	106
Tabla XXIV.- Valores de expresión de Mx en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales con las cepas <i>Alcaligenes faecalis</i> subp. <i>faecalis</i> -1 y <i>Vagococcus fluvialis</i> L21.....	109
Tabla XXV.- Valores de expresión de Casp-3 en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales con las cepas <i>Alcaligenes faecalis</i> subp. <i>faecalis</i> -1 y <i>Vagococcus fluvialis</i> L21.....	112
Tabla XXVI.- Valores de expresión de TNF- α en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales con las cepas <i>Alcaligenes faecalis</i> subp. <i>faecalis</i> -1 y <i>Vagococcus fluvialis</i> L21.....	115

Tabla XXVII.-Parámetros hematológicos en diferentes momentos tras la administración de *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1..... 118

Tabla XXVIII.-Parámetros bioquímicos en diferentes momentos tras la administración de *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1..... 121

A decorative graphic at the top of the page consisting of a blue, textured splash or wave pattern that tapers off to the right.

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Evolución de la Producción en peso (toneladas) de las principales especies acuícolas en Canarias (2015-2019).....	16
Figura 2.- Inhibición del crecimiento de las cepas A11C y frente al patógeno <i>Streptococcus iniae</i> IUSA-1.....	83
Figura 3.- Inhibición del crecimiento de las cepas A12C e I3C frente al patógeno <i>Yersinia ruckeri</i> 3.....	83
Figura 4.- Expresión génica de IL-1 β en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales.....	98
Figura 5.- Expresión génica de IL-6 en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales.	101
Figura 6.- Expresión génica de IL-10 en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales.....	104
Figura 7.- Expresión génica de COX-2 en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales.....	107
Figura 8.- Expresión génica de Mx en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales.	110
Figura 9.- Expresión génica de Casp-3 en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales.....	113
Figura 10.- Expresión génica de TNF- α en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales.....	116
Figura 11.- Concentración en heces de <i>E. coli</i> (A) y <i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. faecalis-1 (B) en diferentes momentos en grupos tratados con <i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. faecalis-1 y evaluados a los: 0 días (justo antes de la administración del probiótico) y 7 días, 15 días y 30 días después de la primera dosis de probiótico. La evolución simultánea de la concentración de ambas cepas se muestra en (C).....	119
Figura 12.- Pérdida de peso corporal, expresada como diferencia en gramos entre el peso justo en el momento de la inoculación de <i>E. coli</i> (7 días) y en el momento de la eutanasia	

(15 días) (A), o como porcentaje de gramos perdidos durante el mismo período de tiempo (B). 120

Figura 13.- Porcentaje de eosinófilos, niveles séricos de urea y ALT entre el grupo de control infectado y el grupo infectado tratado con *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1. 121

Figura 14.- Imágenes histológicas representativas de secciones teñidas con hematoxilina-eosina del peritoneo yeyunal (A, B), los ganglios linfáticos mesentéricos (C, D) y el hilio esplénico (E, F). 123

A decorative graphic at the top of the page featuring a blue, textured splash or wave pattern that tapers off towards the right. The word "ABREVIATURAS" is centered within this graphic.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

%B Basófilos

%E Eosinófilos

%Le Linfocitos

%S Neutrófilos segmentados

AEMPS Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

ADN Ácido desoxirribonucleico

ADNc Ácido desoxirribonucleico complementario

ALT Alanina aminotransferasa

AM Agar Marino

APROMAR Asociación Empresarial de Acuicultura de España

ARN Ácido ribonucleico

AS Agar Sangre

AST Aspartato aminotransferasa

BAL Bacteria ácido láctica

BEE Agar Bilis Esculina Bacteroides

BHIA Agar Infusión Cerebro Corazón

BHIB Caldo Infusión Cerebro Corazón

BUN Nitrógeno ureico en sangre

Casp-3: Caspasa 3

CHOC Agar Chocolate

COX Ciclooxigenasa

CREA Creatinina

Ct Valores de umbral de ciclo

DEPC Dietilpirocarbonato

DO Densidad óptica

ECPs Productos extracelulares

FA Fosfatasa alcalina

FAO Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

HCT: Hematocrito

HGB: Hemoglobina

IFN Interferón

Ig Inmunoglobulina

IL Interleuquina

LAB Bacterias ácido lácticas

LMR Límites máximos de residuos

MALDI-TOF “Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass. Spectrometry”

McK Agar McConkey

mRNA Ácido ribonucleico mensajero

MRS Agar Man Rogosa y Sharpe

NK células Natural Killer

OIE Organización Internacional de Epizootias

OMS Organización Mundial de la Salud

pb Pares de bases

PBS Tampón fosfato salino

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

PLT: Plaquetas

RBC: Glóbulos rojos

TBIL Bilirrubina total

TCBS Agar Tiosulfato Citrato sales Biliares Sacarosa

TNF Factor de necrosis tumoral

TSA Agar Tripticasa-Soja

TSB Caldo Tripticasa-Soja

UFC/ml Unidades formadoras de colonia por mil

WBC: Leucocitos



INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

La acuicultura puede definirse como el cultivo o la producción de organismos acuáticos mediante técnicas encaminadas a hacer más eficiente la utilización de los recursos naturales, englobando una gran variedad de prácticas, especies, sistemas y técnicas de producción (APROMAR, 2020).

Se trata de una actividad socioeconómica con una historia que abarca miles de años, y que, debido a la sobreexplotación de la pesca, tendrá que satisfacer en un futuro próximo la demanda de pescado y otros productos acuícolas, de una población mundial en constante aumento (Kesarodi-Watson *et al.*, 2008; Msangi y Batka, 2015). Razón por la cual, la acuicultura ha comenzado a ganar relevancia en las últimas décadas, convirtiéndose en la industria alimentaria con mayor crecimiento y expansión, que representa en la actualidad el 52% del pescado que se destina a consumo humano (FAO, 2020).

Según la agenda establecida por Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2018), para el año 2030, tanto la acuicultura como la pesca deben cumplir con el objetivo de erradicar la pobreza y llevar a cabo un desarrollo sostenible. No obstante, ese progreso tendrá que enfrentarse a numerosos desafíos, como el cambio climático, la sobrepesca y las enfermedades. Siendo uno de los mayores retos a los que se ha enfrentado recientemente, la enfermedad producida por coronavirus (COVID-19), pandemia que ha dejado numerosas consecuencias socioeconómicas en el sector de la producción y distribución de alimentos, afectando, por tanto, de forma directa a la industria acuícola.

El rápido desarrollo y la consiguiente intensificación de la acuicultura, unido en numerosas ocasiones a unas condiciones higiénico-sanitarias deficientes y al estrés generado en los animales, favorece la penetración y desarrollo de agentes patógenos y, como consecuencia, la aparición de enfermedades, que constituyen un freno muy significativo para la producción (Abarike *et al.*, 2018).

La práctica acuícola, especialmente de forma intensiva, requiere del uso de agentes terapéuticos como métodos profilácticos y/o curativos. Concretamente, para el control de las enfermedades infecciosas, son los antibióticos o antimicrobianos la primera

opción, debido a que actúan de forma rápida y suelen tener amplia disponibilidad. Sin embargo, a pesar de ser una estrategia sencilla y eficaz en un primer momento, su uso indebido trae consigo repercusiones negativas para el medio ambiente y la salud pública. Por dicho motivo, se ha recurrido a la búsqueda de estrategias que traten de solventar la problemática del uso indiscriminado de antibióticos. La primera de ellas, ha sido limitar su empleo en las empresas del sector o, en su defecto, establecer de forma obligatoria los Límites Máximos de Residuos (LMR) que recoge el *Codex Alimentarius*. La segunda opción, sería evitar que los animales enfermen, recurriendo a medidas de prevención, como puede ser el uso de vacunas específicas, inmunoestimulantes, o mediante la utilización de microorganismos capaces de inhibir la acción de agentes patógenos, como los probióticos.

Hoy en día, existen el mercado multitud de vacunas comerciales frente a un gran número de enfermedades acuícolas, pero, además de que su aplicación no es siempre viable y/o efectiva, se presentan numerosas limitaciones en su desarrollo, lo que mermará su disponibilidad en un futuro próximo (Sommerset *et al.*, 2005).

Otra de las opciones que está ganando interés en la industria de la acuicultura como una alternativa respetuosa, tanto para la prevención como para la reducción de la incidencia de enfermedades en los peces, es la utilización de probióticos (Pérez-Sánchez *et al.*, 2011b; Etyemez y Balcázar, 2016). No se trata de una praxis novedosa, ya que estos microorganismos beneficiosos se utilizan desde hace muchos años en humanos y animales terrestres. No obstante, ha sido relativamente reciente su aplicación en acuicultura, convirtiéndose hoy en día, en una estrategia prometedora y con una gran aceptación en el sector, que puede evidenciarse en la abundancia de estudios de investigación publicados en los últimos años (Lazado y Caipang, 2014a).

Los probióticos se definen como “*suplementos vivos microbianos que tiene efectos beneficiosos en el hospedador modificando la flora asociada al mismo y la flora asociada al ambiente*” (Verschuere *et al.*, 2000). Esta definición fue posteriormente modificada y ampliada por Reid *et al.* (2003) incluyendo la frase: “*cuando son administradas en cantidades adecuadas confieren un beneficio saludable para el hospedador*”.

Sin embargo, a pesar de conocer las numerosas ventajas que presenta el uso de probióticos en la industria acuícola, es necesario obtener una mayor información sobre las cepas seleccionadas y la interacción hospedador/microorganismo para desarrollar verdaderas estrategias de control y prevención. Entre las diferentes propiedades que debe cumplir una cepa probiótica, se encuentra: la capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal, expresar una alta tolerancia al pH ácido y a la presencia de sales biliares, ser capaz de adherirse a las superficies intestinales y la modulación inmunológica (Hagi y Hoshino, 2009; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011a; Sica *et al.*, 2012), además de brindar protección mediante la creación de un ambiente hostil para los agentes patógenos mediante la producción de compuestos inhibidores y/o al competir por los lugares de adhesión (Etyemez y Balcázar, 2016).

En los últimos años, la trayectoria del grupo de investigación de “Sanidad de la Acuicultura, Especies Silvestres y Enfermedades Infecciosas” del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha logrado caracterizar de forma completa y proponer nuevas cepas como probióticos para la acuicultura, con importantes aportaciones para la microbiología y la inmunología de estas especies. Pero siendo aún limitadas las especies propuestas y formando parte de proyectos de investigación con otras entidades nacionales y extranjeras, se hace necesario aislar y seleccionar nuevas cepas probióticas para ser utilizadas como medida preventiva frente a diferentes enfermedades infectocontagiosas presentes en la acuicultura.

Por otro lado, se ha evidenciado que algunas cepas probióticas pueden ser beneficiosas tanto para la salud humana como animal (Liu, 2013; Rao *et al.*, 2016; Aceti *et al.*, 2017; Llewellyn y Foey, 2017; Sun *et al.*, 2017; Pratt y Campbell, 2019). La sepsis es una patología muy común que se asocia a altas tasas de morbilidad y mortalidad en medicina humana (Liu *et al.*, 2014), y se ha definido recientemente como "*disfunción orgánica potencialmente mortal debido a una respuesta desregulada del hospedador a la infección*" (Hecker *et al.*, 2019), siendo un serio problema de asistencia sanitaria en medicina humana cuya incidencia va en aumento (García *et al.*, 2018).

A pesar de los avances en antisepsia, las complicaciones sépticas siguen siendo muy comunes en pacientes quirúrgicos en el postoperatorio, y es conocido que son provocadas por microorganismos intestinales, y que el estado de la mucosa intestinal, así

como la microbiota autóctona del paciente, juegan un papel fundamental en la prevención de dichas patologías (Qin *et al.*, 2005). Es la peritonitis o infección de la cavidad intraabdominal, la segunda causa más común de sepsis en las personas (Wheeler y Bernard, 1999), y a su vez, *Escherichia coli* es el agente causal más comúnmente involucrado en este padecimiento (García-Laorden *et al.*, 2017) que afecta tanto a humanos como a roedores (Blanco *et al.*, 2008; Martín-Barrasa *et al.*, 2015), por lo que la inoculación de cepas patógenas de *E. coli* se ha descrito como un modelo experimental clásico de sepsis y peritonitis en ratas (Shukla *et al.*, 2014).

Por todo ello, la finalidad del presente trabajo ha sido aislar y seleccionar cepas bacterianas con características probióticas obtenidas del intestino y agallas de ejemplares de lubina (*Dicentrarchus labrax*), corvina (*Argyrosomus regius*) y lenguado (*Solea solea*), especies de gran relevancia e interés comercial, que puedan ser utilizadas como agentes preventivos frente a infecciones bacterianas en acuicultura, así como evaluar su actividad probiótica en medicina humana frente a una infección por *E. coli* utilizando un modelo clásico de peritonitis fecaloide en rata.

A decorative graphic at the top of the page featuring a blue, textured splash or wave pattern that tapers off towards the right. The word "OBJETIVOS" is centered within this graphic.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Los objetivos planteados para este trabajo han sido:

II.1.- OBJETIVO GENERAL

- Obtención de nuevas cepas probióticas para su uso en acuicultura.

II.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar y caracterizar *in vitro* el mayor número posible de cepas con capacidad potencialmente probiótica frente a patógenos de acuicultura marina y continental.
- Seleccionar de entre todas las cepas caracterizadas *in vitro* aquellas que podrían ser analizadas *in vivo*, para la completa caracterización del probiótico como preventivo de infecciones bacterianas presentes en la acuicultura marina y continental.
- Determinar si las cepas potencialmente probióticas seleccionadas son capaces de modular la respuesta inmune inespecífica en las lubinas (*Dicentrarchus labrax*) tras la su administración a la dieta.
- De la mejor cepa probiótica obtenida en el presente estudio, candidata para su uso en acuicultura, evaluar si existe actividad protectora en otra especie. Concretamente, probaremos su nivel de protección frente a una infección experimental por *E. coli*, utilizando un modelo clásico de peritonitis fecaloide en rata.

A decorative graphic at the top of the page consisting of a blue, textured splash or wave pattern that tapers off towards the right. The text is centered within this graphic.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

III.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

III.1- IMPORTANCIA DE LA ACUICULTURA

III.1.1- LA ACUICULTURA EN EL MUNDO

La acuicultura es una actividad que además de proporcionar alimento a la población, ha contribuido al desarrollo económico mundial. Sin embargo, debido a la pandemia *COVID-19*, se han producido grandes impactos en este sector, afectando a la mayoría de los países del mundo. La Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) está tratando de evaluar el impacto general de la pandemia, tanto en la producción como en el consumo y el comercio de la pesca y la acuicultura.

Según los datos que se recopilan en el informe de esta Organización (FAO, 2020), se estima que el año 2018 la producción mundial de pescado alcanzó un valor aproximado de 179 millones de toneladas, de los cuales, 82 millones de toneladas provienen de producción acuícola. Del total, 156 millones de toneladas se utilizaron para consumo humano y los 22 millones de toneladas restantes se destinaron a producir harina y aceite de pescado principalmente.

La producción total de pescado ha experimentado importantes aumentos en todos los continentes en las últimas décadas, excepto en Europa y en América, mientras que en África y Asia casi se ha duplicado durante los últimos 20 años (FAO, 2020).

Los alimentos de origen acuático son una de las fuentes de proteína animal más importantes, y aportan además aminoácidos, y ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales, por lo que juegan un papel fundamental en la dieta.

Debido a la gran demanda que se ha generado frente a estos productos altamente nutritivos, la pesca y la acuicultura han tenido que unirse, sumando sus producciones y tendrán que seguir haciéndolo. La producción ha ido aumentando de forma continuada en las últimas décadas, superando incluso el ritmo de crecimiento de la población mundial. El informe *SOFÍA* de FAO (2018) recoge que se ha pasado de un consumo per cápita de 9 kg en el año 1961, a 20,5 kg en el año 2017.

Además de contribuir a la seguridad alimentaria y al desarrollo económico de los distintos países reduciendo la pobreza y la desnutrición, la acuicultura contribuye a la utilización eficaz de los recursos naturales con un impacto muy reducido, a la vez que controlable sobre el medio ambiente, por lo que todo indica que el desarrollo de esta actividad va a continuar consolidándose con grandes proyecciones de futuro.

La mayor parte de la acuicultura a nivel mundial se lleva a cabo en Asia, aproximadamente el 92%, siendo China el país líder en producción (Tabla I). La parte restante se distribuye el resto de los continentes, América, Europa, África y en último lugar, Oceanía.

Tabla I.- Principales países productores para la acuicultura por toneladas anuales en 2018 y tasa de variación interanual (APROMAR, 2020).

PAÍS	CANTIDAD (toneladas)	% VARIACIÓN ANUAL
China	66.135.059	2,8%
Indonesia	14.772.104	-8,4%
India	7.071.302	14,3%
Vietnam	4.153.322	8,4%
Bangladesh	2.405.416	3,1%
Filipinas	2.304.361	3,0%
República de Corea	2.278.850	-2,4%
Egipto	1.561.457	7,6%
Noruega	1.355.117	3,6%
Chile	1.287.233	5,5%
TOTAL 10 PRINCIPALES PRODUCTORES	103.324.221	1,9%
RESTO DE PAÍSES	11.183.821	3,1%
TOTAL MUNDIAL	114.508.042	2,0%
España	347.825	11,8%

La principal especie producida en cuanto a valor económico en la acuicultura mundial en el año 2018, fue el langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*) con 24.177 millones de euros, seguido por el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con un valor de 13.714 millones de euros (Tabla II). En cuanto a volumen de producción, el alga laminaria japonesa (*Saccharina japonica*) es la principal especie producida en el mundo con aproximadamente 11,5 millones de toneladas en 2018, y en segundo lugar, el alga Eucheuma (*Eucheuma* spp. y *Kappaphycus* spp.) con 9,2 millones de toneladas.

Tabla II.- Principales especies por valor (millones de euros) producidas mediante acuicultura en el mundo en 2018 y variación interanual (APROMAR, 2020).

ESPECIE	NOMBRE CIENTÍFICO	VALOR (M€)	% VAR. ANUAL
Langostino blanco	<i>(Litopenaeus vannamei)</i>	24.177	7,5%
Salmón atlántico	<i>(Salmo salar)</i>	13.714	2,5%
Cangrejo de las marismas	<i>(Procambarus clarkii)</i>	11.565	44,5%
Carpa china	<i>(Ctenopharyngodon idella)</i>	10.437	3,1%
Carpa plateada	<i>(Hypophthalmichthys molitrix)</i>	8.292	0,9%
Cangrejo de canal chino	<i>(Eriocheir sinensis)</i>	7.694	0,8%
Carpa común	<i>(Cyprinus carpio)</i>	6.983	6,3%
Tilapia del Nilo	<i>(Oreochromis niloticus)</i>	6.581	1,2%
Carpa cabezona	<i>(Hypophthalmichthys nobilis)</i>	5.852	-0,1%
Almeja japonesa	<i>(Venerupis philippinarum)</i>	5.531	-0,6%
TOTAL 10 PRINCIPALES ESPECIES		100.827	6,9%
RESTO DE ESPECIES		110.082	3,9%
TOTAL ACUICULTURA MUNDIAL		210.909	5,3%
Trucha arcoíris	<i>(Oncorhynchus mykiss)</i>	3.103	5,2%
Lubina	<i>(Dicentrarchus labrax)</i>	932	3,1%
Dorada	<i>(Sparus aurata)</i>	865	3,0%
Rodaballo	<i>(Psetta maxima)</i>	322	3,7%
Mejillón europeo	<i>(Mytilus galloprovincialis y Mytilus edulis)</i>	316	12,4%

III.1.2- LA ACUICULTURA EN LA UNIÓN EUROPEA

Aunque en menor medida que el continente asiático, la acuicultura en la Unión Europea (UE) es una fuente relevante de productos de origen acuático. No obstante, la importancia que recibe esta actividad no es la misma en todos los países que la integran, teniendo un papel más significativo en las zonas costeras. Los principales productos que se obtienen del cultivo acuícola son los pescados y moluscos.

La cosecha de pescado en el año 2018 fue de 695.885 toneladas, que supusieron el 51 % en peso del total de la acuicultura. Por otro lado, la producción de moluscos en ese mismo año, sumó un total de 667.934 toneladas, 48 % del total de acuicultura (APROMAR, 2020).

En cuando a las principales especies producidas en la UE (Tabla III), destaca el mejillón (*Mytilus spp.*), seguido por el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), la trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*), y la lubina (*D. labrax*), la cual experimentó un incremento considerable en producción con respecto al año anterior.

Tabla III.- Principales especies producidas en acuicultura en la Unión Europea, por toneladas, en el año 2018 (APROMAR, 2020).

ESPECIE	NOMBRE CIENTÍFICO	CANTIDAD (toneladas)	% VARIACIÓN ANUAL
Mejillón	<i>(Mytilus spp.)</i>	527.192	8,4%
Salmón del Atlántico	<i>(Salmo salar)</i>	179.314	-14,3%
Trucha arcoíris	<i>(Onchorynchus mykiss)</i>	174.987	-5,6%
Ostión japonés	<i>(Crassostrea gigas)</i>	98.681	8,2%
Dorada	<i>(Sparus aurata)</i>	91.964	-3,5%
Lubina	<i>(Dicentrarchus labrax)</i>	84.400	7,0%
Carpa común	<i>(Cyprinus carpio)</i>	75.348	1,7%
Almeja japonesa	<i>(Ruditapes philippinarum)</i>	33.050	-5,9%
Atún rojo del Atlántico	<i>(Thunnus thynnus)</i>	11.181	69,0%
Rodaballo	<i>(Psetta maxima)</i>	8.395	-29,6%
TOTAL 10 PRINCIPALES ESPECIES		1.284.512	0,8%
RESTO DE ESPECIES		80.598	-5,8%
TOTAL ACUICULTURA UE		1.365.110	0,4%

Aunque ha sido muy exitosa la introducción de sistemas modernos de producción en la UE, el ritmo de crecimiento de esta actividad desde el año 2000 ha sido muy escaso, lo cual nos indica la existencia de diversas limitaciones que dificultan el desarrollo de este sector en la región y la necesidad de recurrir a las importaciones, a pesar de que consta con una gran área costera y de condiciones ambientales idóneas para el cultivo de las especies más demandadas por la sociedad en la actualidad. La producción de acuicultura no ha sido capaz de compensar la fuerte reducción sufrida por la pesca extractiva en las dos últimas décadas.

España es el Estado miembro de la UE con una mayor cosecha de acuicultura, con 347.825 toneladas en 2018, suponiendo el 25,5 % del total, seguido por el Reino Unido y Francia. Sin embargo, en cuando al valor de producción, es Reino Unido el principal productor, seguido por Francia y Grecia. En cuanto a este valor, España ocupa la cuarta posición (APROMAR, 2020).

III.1.3- LA ACUICULTURA EN ESPAÑA

La acuicultura en España tuvo su origen en torno a los años 60, y desde entonces, ha experimentado un incremento en su peso específico, pero, sin embargo, no ha sido capaz de compensar el desplome de la actividad pesquera. En el año 2018, la obtención de productos acuáticos se acrecentó un 0,9% respecto al año anterior, obteniendo un valor de 1.276.616 toneladas, según la FAO.

Las principales especies que se cultivan en el país son el mejillón (*Mytilus* spp.), la lubina (*D. labrax*), la trucha arcoíris (*O. mykiss*) y la dorada (*Sparus aurata*).

Las cifras de cosecha acuícola en el año 2019 en nuestro país, sumaron un total de 342.867 toneladas, ocupando la primera posición el mejillón (*Mytilus* spp.) con 261.513 t, la lubina (*D. labrax*) con 27.335 t, la trucha arcoíris (*O. mykiss*) con un valor de 18.955 t y la dorada (*S. aurata*), con 13.521 t como especies principales (APROMAR, 2020).

España dispone de multitud de recursos sobre los que puede incentivar la producción acuícola, tanto de especies marinas como continentales. Entre ellas destacan, sus grandes dimensiones de costa, junto con la presencia de ríos, lagos y diversidad climática, que permite el desarrollo idóneo de multitud de especies acuícolas.

Por tanto, en España podemos encontrarnos con distintos establecimientos acuícolas en función de su localización y el tipo de agua que se requiera para el cultivo de las distintas especies de interés comercial.

En el mar, nos encontramos con los viveros, que consisten en redes flotantes en cuyo interior se crían peces como la dorada (*S. aurata*), la lubina (*D. labrax*) o la corvina

(*A. regius*). A este mismo nivel y también de forma flotante, se recurre a las bateas y *long-lines*, para el cultivo de moluscos bivalvos, fundamentalmente el mejillón (*Mytilus* spp.).

En tierra firme, igualmente se puede emplear agua salada, mediante establecimientos que se construyen cerca de la costa, de donde se obtiene el agua. Este tipo de instalaciones se utilizan comúnmente para la producción de lenguado (*Solea solea* y *S. senegalensis*) y rodaballo (*P. maxima*).

También se puede llevar a cabo la actividad acuícola de agua salada en la playa, la zona intermareal y esteros. La ventaja de estos establecimientos es que la intervención física que se realiza en el medio es mínima. Se recurre a ellos para la crianza de almejas y ostras.

En tierra firme y utilizando aguas continentales, se construyen instalaciones en los márgenes de los ríos, se recurre a los mismos para la producción de trucha arcoíris o esturión.

Los datos estadísticos han evidenciado una importante reducción en el número de establecimientos de acuicultura en España, a medida del transcurso de los años.

La alimentación de las especies de cultivo es un elemento fundamental y de vital importancia en el desarrollo de la actividad acuícola. Es indispensable el conocimiento sobre las materias primas, los nutrientes, la digestibilidad y el correcto manejo del pienso. La presencia en España de fábricas de pienso ha permitido el desarrollo de una gran actividad investigadora e innovadora, en la que no solo intervienen las propias empresas que fabrican el alimento, sino también las empresas de acuicultura, los centros de investigación y las universidades.

- Acuicultura marina en España

Las principales especies marinas obtenidas mediante la acuicultura en nuestro país son la dorada (*S. aurata*), la lubina (*D. labrax*), el rodaballo (*P. maxima*), la corvina (*A. regius*), el lenguado senegalés (*S. senegalensis*), el atún rojo (*Thunnus thynnus*), el mejillón (*Mytilus* spp.), la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), la almeja fina

(*Ruditapes decussatus*) y la almeja babosa (*Venerupis pullastra*), la ostra plana (*Ostrea edulis*), la ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) y los abalones de diversas especies (APROMAR, 2020).

El cultivo de dichas especies marinas se mantuvo en crecimiento desde sus inicios hasta aproximadamente el año 2009. A partir de ahí, ha sufrido un pequeño estancamiento. A finales del año 2019 y comienzos del 2020, debido a sucesos climáticos y epidemiológicos, las pérdidas en producción fueron muy notables, y se sospecha un nuevo decrecimiento próximamente.

Es la Comunidad Valenciana quien se posiciona en primer nivel de producción en el cultivo de especies marinas en España en el año 2019, con una producción de 16.045 toneladas, seguida por Galicia con 8.337 toneladas, Canarias con 8.239 toneladas, Murcia con 6.513 toneladas y Andalucía con 5.644 toneladas (APROMAR, 2020).

- Acuicultura continental en España

En España las principales especies cultivadas mediante acuicultura continental son la trucha arcoíris (*O. mykiss*), así como varias especies de esturiones, esturión del Adriático (*Acipenser naccarii*) y, en menor medida, esturión Siberiano (*Acipenser baerii baerü*), y la tenca (*Tinca tinca*). También existen producciones menores de carpa común (*Cyprinus carpio*) y tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).

La producción de trucha arcoíris en España en 2019 fue de aproximadamente 18.955 toneladas, y las principales regiones productoras son Castilla y León, Galicia, Andalucía, Cataluña, La Rioja, Castilla la Mancha, Asturias y Aragón. Asimismo, se produjeron 2,8 t de caviar y 168,8 t de carne de esturión. De tenca (*T. tinca*), se produjeron 45 t, cultivadas en charcas en la comunidad autónoma de Extremadura y en menor medida en Castilla y León.

III.1.4- LA ACUICULTURA EN CANARIAS

Los inicios de la acuicultura en Canarias se remontan a los años 80 en la isla de Tenerife, pero, no es hasta una década posterior cuando se establece la actividad acuícola como industria productiva en ambas islas capitalinas, así como en la isla de Lanzarote y La Palma.

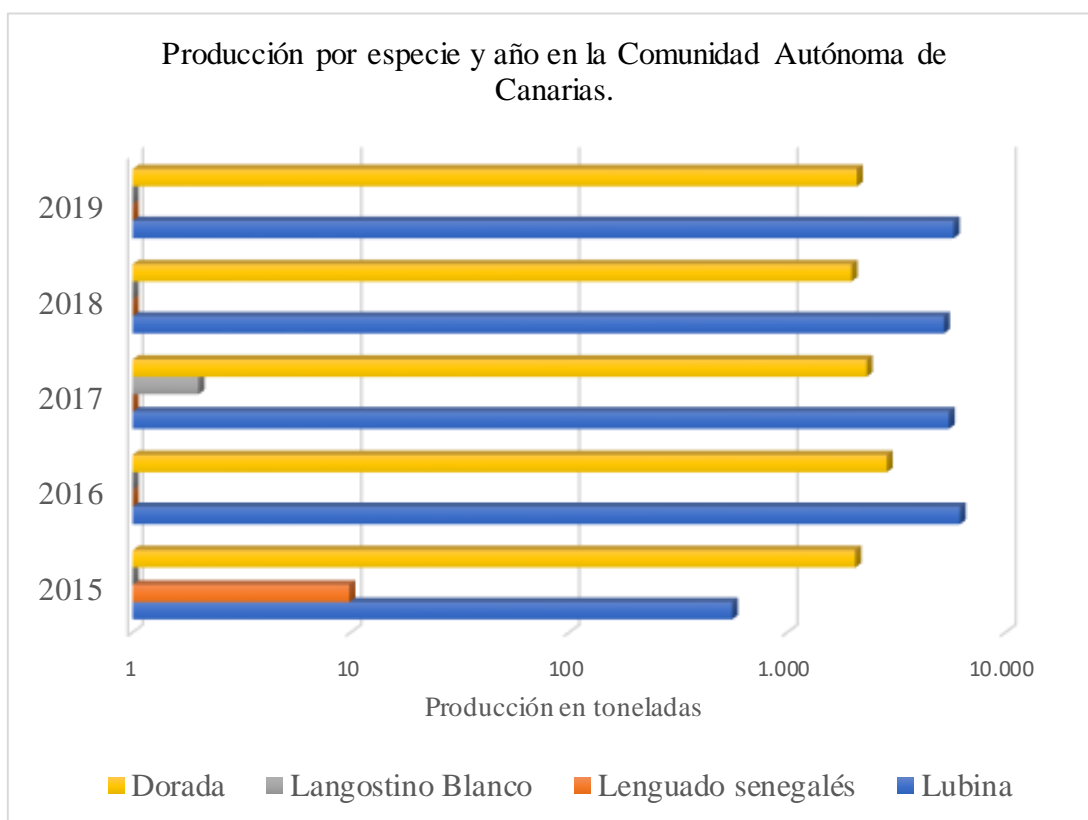
El archipiélago consta de una serie de características que sirven de atractivo para las empresas que desarrollan la actividad acuícola, como son la temperatura de nuestras aguas, así como la riqueza y calidad de las mismas, que permiten que se alcance un desarrollo más acelerado y, por consiguiente, la talla comercial demandada si lo comparamos con la producción en el resto de la UE.

El proceso que se lleva a cabo en Canarias es el engorde de las diferentes especies en el medio marino, es decir, la última fase del cultivo. Los alevines se suelen importar de la península ibérica u otros países europeos, con un peso aproximado entre 5 y 15 gramos. Para llevar a cabo el engorde, se emplean mayoritariamente las jaulas flotantes.

En Canarias no solo se cultivan peces, también se cultivan diferentes especies de microalgas (*Dunaliella salina*, *Spirulina* spp., *Tetraselmis*, y *Arthrospira platensis*), y crustáceos, fundamentalmente el langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*). Las principales especies de peces cultivadas en el Archipiélago a día de hoy son la dorada (*S. aurata*) y la lubina (*D. labrax*), aunque también se ha llevado a cabo el cultivo de lenguado senegalés (*S. senegalensis*).

Como se muestra en la (Figura 3), la producción de estas especies ha variado con el paso de los años. La producción total en peso (toneladas) en el año 2015 fue de 7,648 t y, en el año 2019 fue de 7,877 t. De ese total de producción del año 2019, 5,79 t fueron del cultivo de lubina (*D. labrax*) y el resto, 2,07 toneladas lo aportó el cultivo de dorada (*S. aurata*). En ese año no hubo producción de otras especies de peces. Los últimos datos recopilados de la producción de lenguado senegalés (*S. senegalensis*) se remontan al año 2015, con una producción de 9,8 t. Lo mismo ocurre con el cultivo de langostino blanco (*L. vannamei*), cuyos datos de producción datan del año 2017 con una producción en peso de 2 t (Gobierno de Canarias, Dirección General de Pesca, 2020).

Figura 1.- Evolución de la Producción en peso (toneladas) de las principales especies acuícolas en Canarias (2015-2019).



Fuente: Sistema de información de Primera Venta. Dirección General de Pesca. Gobierno de Canarias.

Según los datos recopilados en el informe de la Asociación Empresarial de Acuicultura en España (APROMAR, 2020), Canarias en el año 2019, ocupaba el tercer lugar de producción cosechada en acuicultura de peces marinos del país, después de la Comunidad Valenciana y Murcia.

También se posicionó en tercer lugar con respecto a la producción de dorada (*S. aurata*), suponiendo un 17,6% de la cosecha total de esta especie en España, y de lubina (*D. labrax*), aportando el 23% de la producción total de dicha especie.

En cuanto a la producción acuícola total de ambas especies en España en el año 2019, Canarias aportó el 21% a dicha producción.

Por otra parte, se están desarrollando diferentes estudios por parte de diferentes instituciones científicas, como por ejemplo el Centro Oceanográfico de Canarias (C.O.C. - I.E.O), con el fin de aumentar la diversidad en las especies de cultivo de peces y también de moluscos, entre ellas el medregal (*Seriola dumerili*), el bocinegro (*Pagrus pagrus*), o el pulpo común (*Octopus vulgaris*).

El Gobierno de Canarias autorizó a partir de 2005 el cultivo de corvina (*A. regius*) en jaulas marinas en Gran Canaria y Tenerife, aunque en la actualidad su producción es muy escasa.

III.2 ENFERMEDADES BACTERIANAS OBJETO DE ESTUDIO DEL PRESENTE TRABAJO

Las enfermedades infectocontagiosas de origen bacteriano constituyen una problemática muy común en la acuicultura. Los agentes patógenos que las causan están presentes de forma natural en el medio, y ocasionan la enfermedad cuando se debilita el sistema defensivo de los peces. Entre las enfermedades bacterianas más importantes que afectan a la acuicultura en España, destacan:

PASTEURELOSIS

La pasteurelosis, también conocida como fotobacteriosis es una enfermedad causada por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, bacteria conocida con anterioridad como *Pasteurella piscicida*. Se trata de un bacilo Gram negativo, oxidasa y catalasa positivo y anaerobio facultativo. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en el año 1963 (Snieszko *et al.*, 1964), en la bahía de Chesapeake (USA), en poblaciones salvajes de perca blanca (*Morone americanus*) y en menor medida en lubina rayada (*Morone saxatilis*).

Se le considera uno de los patógenos más importantes que afecta a las especies marinas de todo el mundo (Wang *et al.*, 2013), así como uno de los más devastadores, debido a que ocasiona numerosas pérdidas económicas, siendo considerada la patología

más grave de los países mediterráneos, afectando a especies como la lubina (*D. labrax*), la dorada (*S. aurata*) y el bocinegro (*P. pagrus*), tanto de cultivo como silvestres.

Los peces afectados se caracterizan por presentar lesiones nodulares prominentes de color blanquecino en los órganos internos (hígado, bazo o riñón), motivo por el que también se le conoce como pseudotuberculosis. Los órganos afectados sufren un agrandamiento y, externamente, suele evidenciarse un oscurecimiento de la piel, distensión abdominal y/o hemorragias a la altura de las aletas y la cabeza. Es una enfermedad que tiene mayor prevalencia en los meses en los que la temperatura del agua alcanza valor superior a los 23°C. Para tratar la enfermedad se suele recurrir al uso de antibióticos, pero, debido a sus negativas repercusiones, se opta por la vacunación para prevenir su aparición.

VIBRIOSIS

La vibriosis es una enfermedad bacteriana sistémica producida por diferentes bacterias pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*. Es considerada como una problemática que ocasiona numerosas pérdidas económicas en la acuicultura de todo el mundo (Mancuso *et al.*, 2015a). Afecta a diferentes especies marinas, de cultivo y silvestres, y tanto a peces como a otras especies de cultivo de gran interés comercial (Mohamad *et al.*, 2019), como camarones, marisco de cultivo y bivalvos (Ina-Salwany *et al.*, 2018). Son agentes causantes de altas tasas de mortalidad en los sistemas acuícolas a nivel mundial (Chen *et al.*, 2000).

La primera vez que se confirmó la enfermedad causada por *Vibrio* se remonta al año 1893, cuando Canestrini informó sobre una epizootia que afectaba a anguilas migratorias por el año 1817, producida por una bacteria denominada en aquel momento *Bacterium anguillarum*. Posteriormente, Bergman (1909) denominó al patógeno como *Vibrio anguillarum*, causante de los brotes de enfermedad roja que afectaba a las anguilas en el Mar Báltico, debido a la similitud en la patogenicidad y en las características de la bacteria. Sin embargo, la taxonomía asociada a la familia *Vibrionaceae* ha ido modificándose con el transcurso de los años. A día de hoy, dentro de la misma se encuentran ocho géneros: *Vibrio*, *Echinimonas*, *Enterovibrio*, *Aliivibrio*, *Grimontia*,

Photobacterium, *Salinivibrio*, y por último, *Thaumasiovibrio*, que ha sido añadido recientemente (Amin *et al.*, 2017).

Las especies que tienen repercusiones devastadoras en los peces de cultivo marinos son: *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. ordalii*, *V. salmonicida*, *V. vulnificus*, *V. harveyi* y *V. ponticus* (Haenen *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018; Mohamad *et al.*, 2019). Estas bacterias se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, oxidasa positivo y anaerobias facultativas, con morfología recta o similar a una “coma”. Pueden crecer y reproducirse en el agua (Ina-Salwany *et al.*, 2018) ya que son ubicuos en el medio marino, fundamentalmente en áreas templadas y tropicales. Muchos actúan también como organismos oportunistas que necesitan la intervención de otros factores para dar lugar a la enfermedad (Mohamad *et al.*, 2019).

Vibrio anguillarum es actualmente la especie más común de este género *Vibrio*, afectando a más de 50 especies de peces en países templados (Mohamad *et al.*, 2019), por lo que es la especie más analizada y caracterizada del género (Hickey y Lee, 2018).

Por otro lado *V. harveyi* es el vibrio capaz de infectar una gama más amplia de animales acuáticos de todo el mundo, incluso actúa como patógeno de larva de crustáceos, especialmente en Asia (Mohamad *et al.*, 2019). Afecta a especies con gran relevancia económica como la trucha arcoíris (*O. mykiss*), el salmón del Atlántico (*S. salar*), el lenguado senegalés (*S. senegalensis*), la lubina japonesa (*Lateolabrax japonicus*), entre otras (Firmino *et al.*, 2019). También destaca *V. alginolyticus* considerado anteriormente como biotipo 2 de *V. parahaemolyticus* (Chart, 2012), que forma parte de la microbiota marina.

A pesar de ser una enfermedad de gran relevancia, la patogenia de la vibriosis sigue siendo poco clara. La vibriosis cursa con un carácter agudo en larvas y alevines, de tal forma que les produce la muerte sin que desarrollen signos clínicos. Por otro lado, los peces adultos suelen presentar una serie de signos característicos. Uno de los más comunes es la letargia (Zhang *et al.*, 2014), úlceras en la piel y en la boca que afectan negativamente a la alimentación del animal (Zhang *et al.*, 2014; Austin y Austin, 2016), lesiones en las aletas (Dong *et al.*, 2017) que repercuten en la movilidad y pigmentación del cuerpo. Se ha evidenciado también ulceraciones en los ojos, así como exoftalmia (Saad y Atallah, 2014). Internamente, los órganos (hígado y riñón) se muestran con un

tamaño aumentado y con hemorragias y congestión (Zhang *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2017). Como *Vibrio* spp. vive en el ambiente acuático, se transmite fundamentalmente a través de la columna de agua. Asimismo, se producirá transmisión horizontal entre los peces a través de las lesiones cutáneas como las úlceras y a través de las heces.

En cuanto al tratamiento y control, es importante aplicar medidas de bioseguridad en los sistemas de cultivo ya que suelen ser efectivas a la hora de controlar las enfermedades infecciosas (Lafferty *et al.*, 2015), como, por ejemplo, establecer cuarentena en los nuevos animales que se incorporen al cultivo. Los métodos tradicionales para prevenir y controlar la vibriosis incluyen la utilización de desinfectantes, vacunas y antibióticos (Hu *et al.*, 2020). Algunos de los antibióticos que se han utilizado para el control de la vibriosis en acuicultura son la tetraciclina, la oxitetraciclina, las quinolonas, los nitrofuranos, las sulfonamidas y la trimetoprima (Laganà *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2014).

Con el uso de vacunas comerciales como AlphaJect 2000™ y AquaVac™ *Vibrio*-*Pasteurella* se han obtenido buenos resultados (Spinós *et al.*, 2017), aunque también se han observado resultados positivos al utilizar otras alternativas para prevenir y controlar la vibriosis en acuicultura como por ejemplo los probióticos, los bacteriófagos e incluso los fitobióticos (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018).

ESTREPTOCOCIAS

La estreptococosis se informó por primera vez en Japón en trucha arcoíris de cultivo (*O. mykiss*), en el año 1957 (Hoshina, 1958). Es una problemática de gran relevancia a nivel mundial que afecta tanto a peces de cultivo como silvestres (Austin y Austin, 2012b). La taxonomía modificada desveló que, al menos, cuatro géneros bacterianos, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* y *Enterococcus*, todos ellos cocos Gram positivos y catalasa negativos, eran los responsables de los brotes aparecidos en los peces. No obstante, el fundamento patológico de este grupo de enfermedades no se ha estudiado en profundidad, debido a que producen lesiones no específicas (hemorragias, congestión u oftalmítis), y a que su diferenciación mediante pruebas bioquímicas convencionales es muy complicada. Por este motivo, se considera al término “estreptococia” como un complejo de enfermedades similares producidas por diferentes

géneros y especies, englobando a las enfermedades producidas por los géneros mencionados anteriormente, entre las que destacamos las siguientes especies: *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus parauberis* (Toranzo *et al.*, 2005).

Son factores que predisponen a la enfermedad las altas tasas de densidad, el incremento de la temperatura del agua, así como condiciones desfavorables de la misma.

La sintomatología clínica que desarrollan los peces afectados incluye: natación errática, hemorragias, opacidad corneal y exoftalmia, pueden aparecer también abscesos alrededor de la boca. Internamente se produce un incremento en el tamaño de los órganos, con la consiguiente distensión abdominal. El control de la enfermedad se suele realizar mediante la vacunación.

ENFERMEDAD DE LA BOCA ROJA

La enfermedad de la boca roja, también conocida como yersiniosis, es una enfermedad de distribución mundial, causada por *Yersinia ruckeri*, una bacteria bacilar Gram negativa que afecta principalmente a salmónidos, aunque también a otras especies de peces (Kumar *et al.*, 2015; Austin y Austin, 2016), siendo la trucha arcoíris (*O. mykiss*) la especie más susceptible a esta enfermedad (Barnes, 2011).

Se caracteriza por producir una infección sistémica, con altas mortalidades y numerosas pérdidas económicas (Austin y Austin, 2016). Los animales infectados presentan hemorragias alrededor de la boca y el ano, en la base de las aletas y en órganos internos. La infección cursa de forma aguda, especialmente en alevines y cuando la temperatura del agua aumenta repentinamente (Barnes, 2011), y de forma crónica en animales adultos. La transmisión de la enfermedad es principalmente horizontal, a través del agua, por medio de las heces de los peces enfermos o portadores (Kumar *et al.*, 2015).

FORUNCULOSIS

El agente causal de la furunculosis es *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, una bacteria Gram negativa que causa una infección oportunista en los salmónidos de piscifactoría (Austin y Austin, 2012a). Tiene una distribución mundial y se caracteriza por una alta tasa de mortalidad y morbilidad (Janda y Abbott, 2010).

La forunculosis puede cursar de forma aguda a crónica. Su nombre deriva de las lesiones características que aparecen en la piel y los músculos de los animales afectados de forma crónica, que suelen ser los peces adultos. Otros signos que pueden aparecer son: letargia, pérdida de apetito, oscurecimiento de la piel y sangrado en la base de las aletas. En esta forma (crónica) suele haber baja mortalidad, lo contrario a lo que ocurre en la forma aguda, que se observa con más frecuencia en los salmónidos juveniles, en los que se desarrolla rápidamente una septicemia, con presencia de lesiones necróticas en piel y hemorragias internas, que causan grandes mortalidades. Se propaga por contacto entre peces infectados o por contaminación del agua con el patógeno (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014).

III.3 CONTROL DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

III.3.1.- ANTIBIÓTICOS

Las enfermedades infecciosas en la acuicultura marina y continental son muy frecuentes y ocasionan numerosas pérdidas económicas. Por este motivo, la industria acuícola ha sido muy dependiente del uso de antibióticos y quimioterapéuticos, constituyendo una estrategia tradicional para el manejo de las enfermedades de los peces (Krishnan, 2014), tanto para su control como para su prevención.

Sin embargo, se ha observado que la utilización de estos compuestos para controlar las distintas afecciones bacterianas, ocasiona numerosos problemas, entre ellos, la propagación de patógenos con resistencia a los medicamentos, la supresión del sistema inmunitario de los peces y otros animales acuáticos, así como diversos peligros ambientales (Allameh *et al.*, 2015). Debido a dichas implicaciones negativas en el medio ambiente por el uso de los antibióticos, se ha restringido en muchos países su uso e incluso

se ha llegado a prohibir aquellos que pudieran tener repercusión directa en la salud humana. Así, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS), junto a varios gobiernos nacionales han planteado la limitación del uso de antibióticos en todos los sectores de la producción, y con especial énfasis en la acuicultura (Avella *et al.*, 2010). Dentro del sector acuícola, se han establecido los límites máximos de residuos (LMR) de aquellas sustancias que supongan daños conocidos, y en algunos casos, su total prohibición.

Los riesgos relacionados con el uso de los antimicrobianos para la salud pública incluyen el desarrollo y la propagación de bacterias resistentes, la propagación de genes de resistencia, así como la presencia de residuos antimicrobianos en los productos destinados a consumo humano. Esta contaminación en los productos comestibles que se comercializan es causa del uso excesivo de los medicamentos que, además, no han sido diseñados específicamente para su aplicación en granjas acuícolas, sino que se recurre al empleo de productos autorizados para otras áreas de la medicina veterinaria (Cabello *et al.*, 2013). Existe, además, una preocupación generalizada por el incremento en el número de cepas bacterianas con resistencia a los antibióticos en nuestro medio ambiente (Hoseinifar *et al.*, 2017). El consumo de pescado contaminado puede producir alteraciones en la microbiota de nuestro organismo o incluso causar reacciones alérgicas o tóxicas, y, en el caso de los animales de cultivo, se asocia también a la modificación de la microbiota intestinal (Ringø y Song, 2015) y dificulta además el tratamiento (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Penders y Stobbering, 2008; Berglund, 2015).

El modo de administración de los antimicrobianos en acuicultura es un agravante de la situación señalada anteriormente. Para esta tarea, se suele emplear la metafilaxis, una forma de administración en la que el medicamento es suministrado a un grupo o colectivo de animales de forma generalizada, es decir, incluyendo poblaciones enteras que engloban tanto a animales enfermos como a animales portadores e incluso sanos. Por este motivo, la dosis administrada en acuicultura suele ser mucho mayor en proporción a la que se necesitaría para la producción de animales terrestres. Adicionalmente, los peces no son capaces de metabolizar de forma eficaz los antibióticos, por lo que la sustancia activa pasa al medio ambiente a través de las heces de los animales (Romero *et al.*, 2012). Si a ello se le suma, que, para la cría o el cultivo de muchas de las especies de acuicultura, se utilizan las jaulas flotantes, existe un riesgo importante, así como una gran

probabilidad, de que las especies acuáticas salvajes puedan ingerir también la medicación, al tener contacto tan estrecho con los animales medicados.

En acuicultura, algunos de los antibióticos autorizados a nivel global para su uso como profilácticos o terapéuticos son la oxitetraciclina, florfenicol, sarafloxacin, eritromicina y sulfonamidas potenciadas con trimetoprima u ormetoprim (Serrano, 2005).

Tratando de reducir el abuso de los antibióticos en acuicultura, se ha buscado alternativas, como la vacunación, los inmunoestimulantes y los probióticos, los cuales han recibido una especial atención debido a su gran abundancia, junto con un bajo coste, así como una adecuada aplicación (Hoseinifar *et al.*, 2018). Además, son capaces de proporcionar beneficios para la salud de los huéspedes cuando se administran en cantidades adecuadas.

III.3.2.- VACUNACIÓN

Uno de los métodos de prevención más utilizados para controlar la multitud de enfermedades víricas, bacterianas y parasitarias que afectan a la acuicultura en la actualidad, es la vacunación, la cual se ha aplicado a numerosas especies de cultivo.

En comparación a la utilización de antibióticos y otros antimicrobianos, las vacunas suelen ser superiores en eficiencia y seguridad. Además, son capaces de mejorar el rendimiento de la producción y obtener mayores beneficios económicos (Ji *et al.*, 2020).

No obstante, una vacuna suele ser útil únicamente contra un patógeno en específico, ya que cuando se tratan de desarrollar vacunas para hacer frente a diversos patógenos, la estructura antigénica de los mismos supone una limitación en su efectividad. Además, se prevé que en un futuro próximo la disponibilidad de las vacunas se verá comprometida debido a limitaciones en su desarrollo (Sommerset *et al.*, 2005). Por otro lado, muchas veces, la utilización de las vacunas en animales juveniles es limitada, debido a que en edades tempranas los peces tienen un sistema inmunológico inmaduro (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018).

En acuicultura se han desarrollado tanto vacunas atenuadas como inactivadas (Baxter, 2007), siendo las vacunas inactivadas con coadyuvante, administradas a los peces mediante inyección intraperitoneal las más utilizadas, aunque también están disponibles mediante administración oral, infiltración anal o spray (Penagos *et al.*, 2009).

Las vacunas inactivadas por métodos físicos o químicos, consiguen eliminar la patogenicidad de las bacterias o los virus, manteniendo la capacidad antigénica de los mismos y estimulando la inmunidad humoral. Son vacunas seguras, pero suele ser necesario vacunar en multitud de ocasiones a los animales, debido a que los antígenos administrados no son capaces de replicarse y se hace necesario administrarlos con adyuvantes. Sólo algunas enfermedades bacterianas que afectan a la acuicultura (enfermedad de la boca roja causada por *Y. ruckeri*, forunculosis por *Aeromonas salmonicida* y las vibriosis), se han podido controlar utilizando estas vacunas inactivadas.

Para solventar el inconveniente de la administración continua, se pueden utilizar vacunas vivas atenuadas, en las que el patógeno puede crecer y reproducirse en el animal, de tal forma que la respuesta inmune se active y obtengamos protección a largo plazo (Spreng *et al.*, 2006). Sin embargo, con este tipo de vacunas, se corre el riesgo de que se produzca la enfermedad. Este tipo de vacunación pueden administrarse por inyección intraperitoneal o por inmersión en el agua (Pang *et al.*, 2018).

Otro tipo de vacuna es la vacuna de subunidades, que se elaboran a partir de epítomos de las bacterias. A su vez, engloba dos modalidades diferentes, dependiendo si los componentes inmunogénicos se obtienen del propio patógeno diana (vacuna de subunidad purificada) o desde otro microorganismo (vacuna de subunidad de ingeniería genética) (Ji *et al.*, 2020).

Gracias a la aplicación de las nuevas tecnologías, se han desarrollado vacunas de ADN. Sin embargo, el factor limitante es que su modo de administración es principalmente la inyección intramuscular, por lo que no sería factible una aplicación a gran escala (Ji *et al.*, 2020).

Hoy en día, laboratorios como Hipra, Europharma y Schering-Plough tienen en el mercado vacunas comerciales, que actúan frente a la mayoría de las enfermedades infecciosas de origen bacteriano que afectan a la acuicultura, como la vibriosis, forunculosis, pasteurelosis, enfermedad de la boca roja, flavobacteriosis, lactococosis,

estreptococosis, piscirickettsiosis y septicemia causada por *Edwardsiella tarda* y *E. ictaluri*, entre otras (Somerset *et al.*, 2005).

III.3.3.- INMUNOESTIMULANTES

Un agente profiláctico que podría abordar el inconveniente de rango de efectividad con las vacunas, es el inmunoestimulante, que ha sido definido como "*un compuesto natural que modula el sistema inmunitario al aumentar la resistencia del huésped contra enfermedades que, en la mayoría de los casos, son causadas por patógenos*" (Bricknell y Dalmo, 2005).

El uso de los inmunoestimulantes se asocia a una mejora de la inmunidad, un incremento en la resistencia a las enfermedades y el favorecimiento del crecimiento de los animales (Amlashi *et al.*, 2011).

Dependiendo de la fuente, los inmunoestimulantes incluyen agentes químicos, componentes bacterianos, polisacáridos, extractos de animales o de algas, factores nutricionales y citoquinas (Sakai, 1999). Dentro de los más utilizados en acuicultura se encuentran los β -glucanos, los lipopolisacáridos y se incluyen también las bacterias con propiedades beneficiosas, denominadas probióticos (Vásquez - Piñeros *et al.*, 2012).

Dentro de este gran grupo de inmunoestimulantes, se encuentran los prebióticos, que se han considerado como un suplemento dietético que mejora la actividad enzimática a nivel digestivo, con el consiguiente beneficio en el crecimiento, y además, resultan beneficiosos para incrementar la inmunidad, así como la resistencia al estrés (Dawood *et al.*, 2015). Son carbohidratos que se clasifican según su tamaño molecular, pudiendo ser monosacáridos, polisacáridos u oligosacáridos. Algunos ejemplos de prebióticos utilizados son la inulina o β -glucano, fructooligosacárido (FOS), oligofructosa, xilooligosacárido (Dawood y Koshio, 2016). Su principal función consiste en el cambio potencial de la comunidad bacteriana intestinal a una dominada por bacterias beneficiosas, lo que favorece la inhibición de la colonización de organismos patógenos (Manning y Gibson, 2004). El uso de prebióticos en acuicultura es muy reciente si lo comparamos con estudios realizados en otras especies terrestres.

Estas sustancias no se digieren, pero establecen esos cambios en la microbiota gastrointestinal, modificando su composición o actividad, con el fin de mejorar la salud general del hospedador (Ringø *et al.*, 2014), actuando también como fuentes de energía (Song *et al.*, 2014).

Además de mejorar la eficiencia de conversión alimenticia, favoreciendo así el crecimiento de los animales, los inmunoestimulantes confieren protección contra los patógenos mediante diversos mecanismos, como la exclusión competitiva en los sitios de adhesión y la producción de ácidos orgánicos (ácido fórmico, acético y láctico), peróxido de hidrógeno y otros compuestos, bacteriocinas, sideróforos, lisozima. Además, son capaces de modular las respuestas fisiológicas e inmunológicas en peces (Nayak, 2010a). La mayor parte de los efectos de los prebióticos sobre la inmunidad son indirectos, ya que no requieren de la respuesta específica a un antígeno, y los efectos que produce se atribuyen a ese cambio en la microbiota, favoreciendo la inmunidad inespecífica frente a una gran variedad de patógenos (Song *et al.*, 2014).

La combinación de prebióticos con probióticos, los simbióticos, son bien conocidos en acuicultura (Ringø y Song, 2015). La presencia simultánea de los probióticos (microorganismos vivos) y prebióticos recompensa al hospedador (Dawood y Koshio, 2016), ya que se incrementa la actividad de los probióticos cuando existe el aporte de los prebióticos (Akhter *et al.*, 2015).

III.3.4.- PROBIÓTICOS

El uso de probióticos se considera una estrategia muy prometedora y aceptada para su utilización en acuicultura. El término probiótico, deriva del griego y se origina de dos vocablos “*pro*” y “*bios*” que significan “*para la vida*”. Fue introducido por primera vez en 1965, definido como "*sustancias secretadas por un microorganismo que estimula el crecimiento de otro*" por Lilly y Stillwell (1965). A partir de esta definición, con el paso de los años, el término fue adquiriendo un significado más amplio, hasta que Parker (1974) lo definió dándole el sentido como lo conocemos en la actualidad, "*organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal*".

Unos años, más tarde, en 1989 Fuller trató de mejorar esa definición haciendo una pequeña distinción: "*Un suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta*

beneficiosamente al animal huésped al mejorar su equilibrio microbiano intestinal". Esta definición hace referencia al efecto beneficioso sobre el hospedador.

Havenaar y Huis In't Veld (1992) ampliaron la definición de probióticos con respecto al hospedador y el hábitat de la microbiota de la siguiente manera: "*Un cultivo mono o mixto viable de microorganismos que se aplica al animal o al hombre, afecta beneficiosamente al hospedador al mejorar las propiedades de la microbiota*".

Una de las más completas en la que se incluye la importancia de la microbiota es la propuesta por Verschuere *et al.* (2000), en la que se enfatiza que los probióticos tienen que ser microorganismos vivos, y se definen como "*suplemento vivo microbiano que tiene efectos beneficiosos en el hospedador modificando la flora asociada al mismo y la flora asociada al ambiente*". Más tarde, Reid *et al.* (2003) modificaron esta definición incluyendo la frase "*cuando son administradas en cantidades adecuadas confieren un beneficio saludable para el hospedador*".

Una definición más reciente es la ofrecida por Salminen *et al.* (2005), que sugiere que los probióticos pueden ser parte de la microbiota gastrointestinal saludable, y que su adición puede ayudar a devolver a la normalidad a una microbiota alterada.

La mayoría de estas definiciones hacen referencia al hombre y a mamíferos, por lo tanto, se deben tener en cuenta ciertos factores que difieren de los probióticos terrestres (Denev *et al.*, 2009). En animales acuáticos la microbiota depende del medio con el cual está en constante interacción, siendo este medio, la dieta y la edad los responsables de la misma, llegando a ser estable en la etapa adulta del animal (Cahill, 1990). Esa interacción íntima de las especies acuáticas con el medio ambiente, obligaron a establecer una definición más precisa de probiótico, debido a que no existe una delimitación entre la microbiota interna y externa del animal, al interaccionar constantemente con el ecosistema, por lo que se hace imposible definir el papel exacto de los probióticos (Vadstein *et al.*, 2013).

Sin duda, la definición más utilizada es la que propone la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), que definen los probióticos como "*microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del hospedador*".

El concepto de probióticos acuáticos es relativamente nuevo, pero era de necesidad establecer una definición contextualizada en la acuicultura. Desde este enfoque, los probióticos se definen como “*microorganismos vivos o muertos, o incluso un componente del microorganismo que actúan bajo diferentes modos de acción al conferir efectos beneficiosos al hospedador o su entorno*” (Lazado y Caipang, 2014a).

Los probióticos comúnmente utilizados en acuicultura pertenecen a distintos grupos, y generalmente son bacterias ácido lácticas o cepas bacterianas que pertenecen a los géneros *Vibrio*, *Bacillus* y *Pseudomonas* (Balcázar *et al.*, 2007; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011a). Igualmente, aunque con menor interés, se describen los géneros *Aeromonas*, *Alteromonas* y *Flavobacterium* al igual que algas unicelulares y levaduras (Ringø *et al.*, 2010).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) han resultado muy interesantes como probióticos en acuicultura (Ringø *et al.*, 2018) y están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Engloban alrededor de 20 géneros que pertenecen al phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli* y orden *Lactobacillales*. Poseen morfología de bastón y son Gram positivos, catalasa y oxidasa negativos, y no suelen ser móviles. Se dividen en homofermentativos (producen ácido láctico a partir de azúcares), o heterofermentativos (producen ácido láctico, ácido acético, alcohol y dióxido de carbono) (Ringø, 2020).

Los probióticos muestran numerosas ventajas como su bajo costo, su abundancia, así como la idoneidad en su aplicación (Hoseinifar *et al.*, 2018). Además, existen diversas fuentes para la adquisición de probióticos destinados a acuicultura como son los intestinos, las branquias, el mucus de la piel o el propio hábitat de los peces. Incluso se puede recurrir a colecciones de cultivo y productos comerciales (Hai, 2015b).

Hasta la fecha, se han propuesto una amplia gama de bacterias para su aplicación como probióticos (Kesacordi-Watson *et al.*, 2008). Sin embargo, su utilización en acuicultura a gran escala tiene numerosas limitaciones debido a preocupaciones biotecnológicas (Lazado *et al.*, 2015). Aun así, son numerosos los estudios que se han realizado sobre la selección de posibles cepas probióticas (Gatesoupe, 1999; Vijayabaskar y Somasundaram, 2008; Harikrishnan *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012). Aunque con el reciente desarrollo de un modelo de sistema libre de microorganismos para las larvas de lubina (*D. labrax*), se ha abierto una enorme posibilidad a la realización de más estudios

controlados en las interacciones hospedador-microbio y los efectos de pre y probióticos (Dierckens *et al.*, 2009; Schaeck *et al.*, 2016). Algunos probióticos ya están disponibles comercialmente en el mercado (Banerjee y Ray, 2017), como el BACTOCELL® *Pediococcus acidilactici* CNCMI-4622 (anteriormente *Pediococcus acidilactici* CNCM MA 18/5M), primer y único probiótico autorizado en acuicultura para peces y crustáceos en la Unión Europea, registrado como estabilizador de la flora intestinal, y situado en la categoría de aditivos zootécnicos para piensos. Recientemente ha obtenido nuevas autorizaciones recogidas en el Reglamento de Ejecución (UE) 2020/151 de la Comisión, de 4 de febrero de 2020, incluyendo a todas las especies de peces y todos los crustáceos. Con este reglamento se deroga el Reglamento de Ejecución (UE) n° 95/2013 relativo a la autorización de *Pediococcus acidilactici* CNCM MA 18/5M como aditivo para piensos destinados a todos los peces, exceptuando a los salmónidos. Este aditivo desempeña una gran función en el equilibrio de la microbiota intestinal, favoreciendo su madurez e incrementando por tanto su eficiencia digestiva.

La administración de los probióticos depende de varios factores, entre ellos la dosis, la duración de la administración, y las cepas probióticas en sí (Ringø, 2020). Una estrategia muy común de administración de las cepas seleccionadas como probióticos en animales acuáticos es a través de la dieta, también junto al alimento vivo (artemia y rotíferos), o en el agua de cultivo (Merrifield *et al.*, 2010), y aunque son los aditivos en alimento/dieta balanceada los más utilizados en acuicultura, no hay evidencia de que alguno de los métodos sea mejor que el otro (Hai, 2015a). Han sido probados en diferentes colectivos de animales acuáticos como peces, moluscos, crustáceos, equinodermos y mamíferos marinos, con diferentes tamaños y pesos, así como en acuariofilia (Avella *et al.*, 2010). Igualmente, los probióticos se pueden aplicar solos o en combinación con otros probióticos (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Allameh *et al.*, 2015), estrategia que ha ganado mucho interés en la última década (Mukherjee *et al.*, 2019).

En cuanto a la dosificación, se han aplicado un amplio rango de dosificaciones de cepas probióticas en la dieta, siendo quizás la concentración más utilizada la que se sitúa entre los valores de 10^5 - 10^9 UFC/g de pienso (Hai, 2015a).

Otro de los aspectos a señalar, es que existe un contraste de ideas sobre si los microorganismos asociados al hospedador serán mejores que si se aíslan fuera del mismo.

Aunque Boutin *et al.* (2013) señalaron que existirá una mayor tolerancia cuando las cepas probióticas se aíslan del propio animal o de su misma especie, lo que no está claro es si los microorganismos derivados del hospedador tendrán mejores resultados como probióticos frente a aquellos de origen externo (Lazado *et al.*, 2015). Pero de lo que no cabe duda, es que, si utilizamos microorganismos propios de la microbiota del animal como candidatos a probióticos, las repercusiones negativas que pueden afectar a su viabilidad, como son las propiedades físico-químicas del entorno, se verán reducidas, ya que las actividades fisiológicas de la cepa serán óptimas en su propio hábitat, y tendrán más capacidades de sobrevivir, es decir, que la fuente de los probióticos contribuirá al éxito de su aplicación. Sería una buena opción también, combinar microorganismos huéspedes y no huéspedes, siempre que no sean inhibidores entre sí para aprovechar los beneficios de ambos.

No existe un solo microorganismo capaz de utilizarse de forma universal y tampoco es un requisito necesario, sin embargo, son una ventaja aquellos con actividad frente a una amplia gama de huéspedes, aunque se debe ser precavido al extrapolar las propiedades probióticas, debido a que se han observado complicaciones en estudios humanos (Marteau, 2011).

Lo que está claro, es que los probióticos cada vez se utilizan más en acuicultura, y el aspecto más analizado ha sido la mejora en la salud animal en general (Gatesoupe, 1999), siendo considerados como una estrategia prometedora para controlar las enfermedades, mejorar la digestión de los alimentos y la calidad del agua de cultivo entre otros beneficios.

III.3.4.1.- Funciones de la microbiota natural en los peces

Ecológicamente, tanto los microorganismos beneficiosos como los patógenos conviven en espacio y tiempo en el medio acuático. Por este motivo, muchos de los microorganismos causantes de enfermedades importantes en acuicultura forman parte de la microbiota normal, y pueden actuar como patógenos oportunistas u obligados (Hansen y Olafsen, 1999) cuando se den las condiciones necesarias.

La defensa inmune en peces está formada por los tejidos linfoides asociados a las mucosas, que se dividen a su vez en tejidos linfoides asociados a la piel, tejidos linfoides asociados a las branquias y tejidos linfoides asociados al intestino (Lazado y Caipang, 2014b).

En las superficies mucosas de los peces se localiza una población importante de microbiota comensal, es decir, que no producen daño alguno al hospedador cuando existe homeostasis, pero sí que actúan como barrera protectora frente a posibles patógenos. Al ser tan extensa y en contacto con el medio en el que habitan los animales, su naturaleza nos indicará sobre la población existente en el entorno en el que viven, por lo que es habitual que podamos encontrar gran variedad de especies (Cahill, 1990).

El sistema inmunológico de las mucosas tiene un papel esencial contra los patógenos (Dongarrà *et al.*, 2012). Esa capa mucosa de la piel es la primera línea de defensa, e incluye diversos componentes del sistema inmunológico innato, como son la lisozima, las inmunoglobulinas, la proteasa, las proteínas C-reativas, las enzimas proteolíticas, etc (Subramanian *et al.*, 2007).

Después de la piel, son las branquias el órgano mucoso que interactúa estrechamente con el entorno externo y que constituye la puerta de entrada de multitud de patógenos. El tejido linfoide asociado a las branquias está compuesto por linfocitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y células secretoras de anticuerpos (Dos Santos *et al.*, 2001).

Por otra parte, se encuentra la microbiota intestinal, en la que intervienen factores nutricionales, microbiológicos, genéticos y ambientales, es decir, está influenciada tanto por la ecología del hospedador como por su entorno (Wong y Rawls, 2012). Tiene un papel fundamental en el sistema inmune, ya que es capaz de modular la maduración del tejido linfoide asociado al intestino y, actúa como una barrera frente a microorganismos (Pérez *et al.*, 2010). Se divide en: barreras físicas, componentes humorales y componentes celulares. En cuanto a los parámetros humorales se distinguen los péptidos antimicrobianos, la lisozima, los componentes del complemento, las pentraxinas, las lectinas, las antiproteasas y los anticuerpos naturales. Los elementos celulares innatos están constituidos por las células citotóxicas y los fagocitos.

En los últimos años se le ha prestado gran atención a la microbiota huésped como una fuente alternativa o reservorio de probióticos candidatos. Concretamente, al tracto gastrointestinal, considerando al intestino como una importante fuente biológica para candidatos probióticos (Lazado y Caipang, 2014a).

Esta microbiota gastrointestinal cumple diversas funciones a lo largo de toda la vida del animal. Una función metabólica, que contribuye a la digestión y absorción de nutrientes, una función trófica, que favorece el crecimiento y diferenciación celular además de estimular el sistema inmune del animal. Y, por último, una función protectora frente a los microorganismos patógenos externos, por lo que se hace fundamental el conocimiento sobre la microbiota de los animales de cultivo y sus posibles efectos (Escobar *et al.*, 2006).

En la microbiota gastrointestinal de los peces marinos predominan los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas*, mientras que, en los peces de agua dulce, además de *Pseudomonas*, predominan los géneros *Aeromonas*, *Pleisomonas*, y diferentes géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (Cahill, 1990).

No se debe olvidar que, como en acuicultura el hábitat microbiano sufre alteraciones continuas, se producen constantemente modificaciones en la estructura y funciones de la comunidad microbiana (Verschuere *et al.*, 2000), y si se combinan múltiples candidatos probióticos se pueden obtener mayores beneficios (Ibrahim, 2015). Sin embargo, por este mismo motivo es muy difícil obtener una cepa potencialmente probiótica que tenga aplicación universal, debido a las peculiaridades y diferencias fisiológicas de cada animal y las influencias del medio.

III.3.4.2.- Criterios de selección de una cepa probiótica

Al seleccionar un nuevo microorganismo para probarse como un probiótico efectivo, debe someterse tanto a experimentos *in vitro* como *in vivo*, teniendo siempre presente que su modo de acción dista mucho de lo que ocurriría en los sistemas terrestres (Song *et al.*, 2015).

Para que pueda ser considerado como buen candidato probiótico, debe cumplir una serie de requisitos. En primer lugar, que sea inocuo, es decir, que no cause patogenicidad en el animal (Zokaeifar *et al.*, 2012b). Por otro lado, que sea capaz de soportar los niveles de pH del sistema digestivo de los animales, para garantizar su viabilidad, así como también la presencia de sales biliares que serán secretadas durante el proceso de la digestión (Buchinger *et al.*, 2014).

Otro factor indispensable, es que tenga la capacidad de adherirse a las superficies intestinales y modular el sistema inmune (Hagi y Hoshino, 2009; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011a; Sica *et al.*, 2012).

Y, por último, y siendo quizás la característica más importante, es que presente actividad antagonista o que, en su lugar, sea capaz de inhibir el crecimiento de los patógenos, proporcionando protección al hospedador mediante la creación de un ambiente hostil para dichos patógenos, mediante la producción de compuestos inhibidores o compitiendo por los sitios de adhesión (Etyemez y Balcázar, 2016).

Son numerosas las características que debe cumplir un candidato probiótico, pero como es poco probable que cumpla con todas ellas, se debería explorar en mayor profundidad la posibilidad de combinar simultáneamente varios probióticos o realizar una mezcla simbiótica de probióticos junto a prebióticos (Ibrahim, 2015).

III.3.4.3.- Mecanismos de acción de los probióticos

A diferencia de otras alternativas para controlar las enfermedades en acuicultura, como las vacunas, los antimicrobianos y los inmunoestimulantes, los probióticos proporcionan beneficios favorables adicionales (Verschuere *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2008).

Los probióticos actúan bajo diferentes modos de acción para luchar contra las enfermedades, compitiendo por los nutrientes o por lugares de fijación y adhesión, produciendo compuestos inhibidores frente a los patógenos, estimulando la inmunidad del hospedador, favoreciendo el crecimiento de los animales y/o mejorando la calidad de agua entre otros. Pero, sobre todo, será la capacidad para estimular la respuesta inmune e

inhibir el crecimiento de bacterias patógenas lo que va a favorecer la salud de la acuicultura (Dawood *et al.*, 2017).

- Competición por nutrientes

Competir con otros microorganismos por la energía y los nutrientes disponibles, es fundamental para la supervivencia de cualquier población microbiana (Verschuere *et al.* 2000). Y es también, uno de los mecanismos mediante el cual, los probióticos, son capaces de inhibir a los patógenos (Ringø *et al.*, 2015). Así, las cepas probióticas pueden utilizar los nutrientes disponibles para los microorganismos patógenos y restringir su presencia en el tracto intestinal, ya que no serían capaces de sobrevivir sin ellos (Hai, 2015b). La captura de los nutrientes se favorece mediante la secreción de moléculas que descompongan a su vez las macromoléculas o moléculas más complejas, haciendo así más accesibles los nutrientes (Knipe *et al.*, 2020).

Estudios anteriores han evidenciado que muchas cepas bacterianas compiten por el hierro, que es un elemento fundamental para el crecimiento de los microorganismos. Sin embargo, la disponibilidad del mismo, en los tejidos y fluidos corporales de los animales es limitada (Verschuere *et al.*, 2000). Los sideróforos, son agentes aglutinantes de hierro, que ayudan a las bacterias a obtener la cantidad necesaria de este elemento para su crecimiento (Neilands, 1981), y así, la presencia de sideróforos se ha reconocido como un factor relevante para determinar la virulencia de las cepas bacterianas (Gram *et al.*, 1999; Balcázar *et al.*, 2006). Por lo tanto, las bacterias productoras de sideróforos podrían ser utilizadas como probióticos, secuestrando el hierro y limitando la disponibilidad de este compuesto necesario para el crecimiento de las bacterias patógenas (Tinh *et al.* 2008; Lazado *et al.*, 2010).

El carbono es otro de los elementos necesarios para el metabolismo de los microorganismos, y existen en la microbiota gastrointestinal de los peces, cepas que compiten también por este compuesto (Verschuere *et al.*, 2000).

- Producción de compuestos inhibidores

Los probióticos son capaces de producir sustancias o compuestos inhibidores, sustancias químicas que pueden ser tóxicas/bactericidas o inhibidoras/bacteriostáticas hacia otros microorganismos (Balcázar *et al.*, 2006), como el peróxido de hidrógeno, las bacteriocinas, las lisozimas y otros compuestos (Panigrahi y Azad, 2007). Los compuestos inhibidores son capaces de suprimir o incluso llegar a matar a los patógenos. Algunas bacterias producen ácidos orgánicos y ácidos grasos volátiles (ácidos láctico, acético, butírico y/o propiónico), que pueden reducir el pH en la luz gastrointestinal y, por tanto, inhibir la proliferación de patógenos oportunistas (Tinh *et al.*, 2008).

También se ha observado que algunas bacterias beneficiosas afectan al crecimiento y/o la actividad de los patógenos mediante la modulación en la transducción de señales, produciendo compuestos que interrumpen los mecanismos de detección de quorum sensing (QS) en patógenos (Nayak, 2010b). Se trata de un mecanismo regulador que controla la expresión de diversas macromoléculas biológicas como, por ejemplo, los factores de virulencia (Chauhan y Singh, 2018), y así, la interrupción del QS se considera una potencial estrategia antiinfecciosa en acuicultura (Defoirdt *et al.*, 2004). Por ejemplo, Medellín-Peña *et al.* (2007) observaron que la cepa *Lactobacillus acidophilus* La-5 secreta una o varias moléculas que son inhibidoras de la señal QS de *E. coli* O157.

- Competición por lugares de fijación

Es un mecanismo efectivo para evitar la colonización de los patógenos en las mucosas (Balcázar *et al.*, 2006), debido a que muchos patógenos necesitan adherirse a la mucosa del tracto gastrointestinal del hospedador para poder desarrollar la enfermedad (Adams, 2010). Se le conoce también como exclusión o inhibición competitiva, en la que la microbiota reduce o impide la colonización del patógeno bacteriano que compite por la misma ubicación. El probiótico coloniza el intestino y se inhibe la adherencia y/o colonización de las bacterias patógenas (Ringø *et al.*, 2010). Por este motivo, se considera un pre-requisito clave al seleccionar una cepa como probiótica (Nikoskelainen *et al.*, 2001b). Un ejemplo son los lactobacilos, microorganismos intestinales no patógenos que

compiten con agentes patógenos por los sitios de adhesión, que se encuentran generalmente en las vellosidades intestinales (Zorriehzahra *et al.*, 2016).

La adhesión puede ser inespecífica, mediante la presencia de agente fisicoquímicos como la hidrofobicidad, o específica, mediante la adhesión a la superficie de las bacterias adherentes o a las moléculas receptoras en las células epiteliales (Salminen *et al.*, 1996; Lazado *et al.*, 2015).

Balcázar *et al.* (2008) evaluaron la capacidad para inhibir la adhesión de patógenas de peces con tres bacterias ácido lácticas (*Lactococcus lactis* CLFP 101, *Lactobacillus plantarum* CLFP 238, y *Lactobacillus fermentum* CLFP 242), en la que se obtuvieron resultados muy positivos frente a todas o varias de las cepas patógenas probadas.

- Aumento de la respuesta inmune

La estimulación de la respuesta inmune es otra de las capacidades de los probióticos para promover y/o mejorar la salud en acuicultura (Dawood *et al.*, 2017), y se utiliza como una importante estrategia profiláctica en teleósteos. Los probióticos son capaces de regular tanto la respuesta inmune innata o inespecífica a través de la modulación de respuestas inmunes humorales y la expresión génica (Verschuere *et al.*, 2000), como la respuesta inmune adquirida o específica (Lazado y Caipang, 2014b).

Diversos factores, tales como la dosis, la fuente, o la duración de la suplementación con las cepas probióticas, van a afectar a dicha actividad (Hai, 2015b). Las citoquinas son uno de los reguladores fundamentales de la respuesta inmune en los peces (Secombes *et al.*, 2011), y son las responsable de establecer la conexión entre las respuestas innata y adquirida, siendo los probióticos los responsables de la activación de estos mensajeros químicos (Gómez y Balcázar, 2008; Nayak, 2010a; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011b).

Se demostró que la cepa *Vagococcus fluvialis* L21, que presentó efecto protector en lubinas (*D. labrax*) frente a la infección por *Vibrio anguillarum* (Sorrosa *et al.*, 2012), era capaz de modular la respuesta inmune inespecífica mediante ensayos *in vitro* (Román *et al.*, 2012, 2013).

- Mejora de la calidad del agua

Se sabe que la manipulación de los parámetros de cría de agua tiene impactos directos (positivos o negativos) en el organismo. La contaminación del agua de cultivo, bien por excrementos o por exceso de alimentos, es una de los principales factores que afectan negativamente a los sistemas de producción.

La adición o aplicación directa de probióticos al agua de cría, también es una de las estrategias utilizadas. Se ha observado que administrando probióticos al agua de cría se puede aumentar la calidad de la misma, e incluso disminuir el número de cepas bacterianas patógenas (Qi *et al.*, 2009). Tras su aplicación se ha observado una mejora en la calidad de los parámetros del agua de cultivo como la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto, el amoníaco y el sulfuro de hidrógeno (Chauhan y Singh, 2018).

El uso de bacterias Gram positivas como probióticos, especialmente del género *Bacillus*, causan efectos beneficiosos en la calidad del agua de cultivo (Hai, 2015a; Dawood y Koshio, 2016), siendo eficaces al convertir materia orgánica en CO₂, limo o biomasa bacteriana, y equilibrando la producción de fitoplancton (Balcázar *et al.*, 2006; Chauhan y Singh, 2018). También se ha señalado que las bacterias probióticas poseen actividad alguicida, afectando diversas especies de microalgas (Fukami *et al.*, 1997), y que las bacterias nitrificantes contribuyen a incrementar el número de especies microbianas en el agua y a eliminar la toxicidad del amoníaco y los nitratos (Mohapatra *et al.*, 2012; Zorriehzaha *et al.*, 2016), entre los que se incluyen géneros como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Alkaligenes* y *Rhodopseudomonas* entre otros (Antony y Philip, 2006; Zhou *et al.*, 2010a; Padmavathi *et al.*, 2012).

- Producción de compuestos beneficiosos: contribución enzimática y fuente de macro-micro nutrientes

Se conoce que la manipulación en la nutrición es una buena estrategia para aumentar la resistencia a las enfermedades en peces (Oliva-Teles, 2012), y se ha

demostrado que la utilización de cepas probióticas aporta numerosos efectos beneficiosos en el sistema digestivo de los animales acuáticos, mejorando la digestibilidad de los nutrientes, incrementando la eficiencia alimenticia y, por tanto, la tasa de crecimiento (Hoseinifar *et al.*, 2017).

Con la adición de probióticos al pienso, mejoramos la utilidad del mismo (Hai, 2015b), pues estos microorganismos son capaces de mejorar el apetito de los animales (Hai, 2015a) e incluso actuar por ellos mismos como una fuente de alimento complementario (Verschuere *et al.*, 2000; Hai, 2015b), constituyendo una importante fuente proteica (Qiu y Davis, 2017) y de otros nutrientes como ácidos grasos y vitaminas para las especies de cultivo (Vine *et al.*, 2006), siendo la vitamina B12 una de las más estudiadas (Sugita *et al.*, 1991).

Muchos de los beneficios señalados anteriormente, son posibles gracias a su contribución en la producción o incremento de la actividad enzimática, de enzimas tales como las lipasas, proteasas, amilasas y quitinasas (Shen *et al.*, 2010; Zokaeifar *et al.*, 2012a; Hai, 2015b; Seenivasan *et al.*, 2016; Hoseinifar *et al.*, 2017).

En un estudio realizado por Suzer *et al.* (2008) se observó que la suplementación de la dieta con probióticos comerciales (*Lactobacillus* spp.) durante 35 días en dorada (*S. aurata*) durante el estadio larvario, incrementó la actividad de las enzimas lipasas. Lo mismo se observó al incorporar levadura viva (*Debaryomyces hansenii*) en la dieta de larvas de lubina (*D. labrax*), que incrementó además la actividad de la amilasa, favoreciendo la digestibilidad de los carbohidratos (Tovar *et al.*, 2002).

Castro *et al.* (2013) observaron una mejora en las actividades enzimáticas de amilasa y proteasa en dorada (*S. aurata*), así como una mejora en la actividad de la amilasa en la corvina (*A. regius*) con una dieta suplementada con *Saccharomyces pastorianus*.

- Aumento de las tasas de crecimiento y supervivencia

Muchos estudios han señalado que la aplicación de probióticos mejora la utilización del alimento, la conversión alimenticia y, por tanto, las tasas de crecimiento y el aumento de peso de los animales acuáticos (Allameh *et al.*, 2015; Hai, 2015b;

Zorriehzahra *et al.*, 2016). Además, al mejorar el apetito también se favorece un mayor crecimiento (Newaj-Fyzul y Austin, 2014).

La levadura probiótica (*Saccharomyces cerevisiae*) afectó el rendimiento de crecimiento de las larvas de lubina (*D. labrax*) y las actividades enzimáticas de los peces (Tovar *et al.*, 2010). Bhatnagar y Lamba (2015) también obtuvieron resultados muy favorables tras alimentar a carpas hindúes (*Cirrhinus mrigala*), con la bacteria probiótica *Bacillus cereus* aislada de la microbiota intestinal, obteniendo altos valores de crecimiento, junto con un incremento del peso de los animales, así como una alta digestibilidad de proteínas en comparación con los animales alimentados sin el probiótico.

- Efecto antiviral

Kamei *et al.* (1988) llevaron a cabo un estudio en el que demostraron propiedades antivirales de una cepa bacteriana frente a un virus, concretamente contra el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI). Posteriormente se ha señalado que la administración de probióticos es eficaz para controlar las enfermedades virales (Lakshmi *et al.*, 2013), aunque no está muy claro el mecanismo exacto a través del cual las bacterias probióticas muestran dichos efectos frente a los virus. Mediante estudios *in vitro* se ha observado que la inhibición puede deberse a la secreción de enzimas extracelulares por parte de las bacterias, y así, por ejemplo, diferentes especies de *Aeromonas* spp., *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp. y *Vibrio* spp., han mostrado actividad antiviral contra el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (Kamei *et al.*, 1988; Zorriehzahra *et al.*, 2016).

- Efecto antifúngico

Pocos estudios han analizado la capacidad antifúngica de las cepas probióticas. Sin embargo, Lategan *et al.* (2004b) aislaron la cepa A199 de *Aeromonas* spp. del agua de cultivo de anguila (*Anguilla australis*) y observaron una fuerte actividad inhibidora

contra *Saprolegnia* spp. Años más tarde, Nurhajati *et al.* (2012), también demostraron que *Lactobacillus plantarum* FNCC 226 poseía potencial inhibitorio en el bagre (*Pangasius hypophthalmus*) contra *Saprolegnia parasitica* A3. En un estudio posterior, la cepa *Burkholderia* spp. mostró una fuerte actividad antifúngica contra el crecimiento de hifas, así como la germinación de esporas de *Saprolegnia* spp. (Zhang *et al.*, 2019).

III.3.4.4.- Los probióticos como preventivo de enfermedades en acuicultura

Aunque no hayan evidencias de que los probióticos sean mejores que los inmunoestimulantes o las vacunas, no cabe duda de que seguirán siendo un enfoque prometedor para el control de enfermedades en acuicultura (Newaj-Fyzul y Austin, 2014).

La extensa y dilatada literatura sobre probióticos en este sector ha mostrado efectos beneficiosos sobre las defensas intestinales de los peces, lo cual es de relevancia vital para la prevención de enfermedades. Sin embargo, los beneficios que se obtienen tras su aplicación va a diferir dependiendo de la especie, la etapa y el sistema de cultivo, afectándose al rendimiento de los mismos (Sorroza, 2012).

La variedad de microorganismos que se utilizan como probióticos en acuicultura es muy amplia, dentro de los más empleados podemos encontrar bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Roseobacter* y *Zooshikella*. También se emplean levaduras, bacteriófagos y algas unicelulares (Ringø *et al.*, 2010).

Un ejemplo de alga unicelular con capacidad de inhibición es *Skeletonema costatum*, que produjo sustancias tóxicas capaces de inhibir el crecimiento de patógenos de interés en acuicultura, como *Vibrio anguillarum* (Naviner *et al.*, 1999). También se ha señalado que la cepa bacteriana *Thalassobacter utilis* inhibió el crecimiento de este patógeno e incluso mejoró la tasa de supervivencia de las larvas de cangrejo (*Portunus trituberculatus*) y mostró actividad antifúngica frente a *Haliphthoros* spp. (Nogami *et al.*, 1997). Igualmente, unas cepas de las especies *Bacillus cereus* y *Paenibacillus polymyxa*, aisladas del agua de mar, sedimentos y tracto intestinal de peces sanos (*Lates calcarifer*),

inhibieron eficazmente a *Vibrio* spp. y *V. harveyi* tanto *in vitro* como *in vivo* en larvas de camarón (Ravi *et al.*, 2007).

Balcázar *et al.* (2007), demostraron que las cepas LAB (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CLFP100 y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CLFP102) tenían actividad antibacteriana frente a *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* y *Y. ruckeri*. Zhou *et al.* (2010b) también indicaron la capacidad de inhibición del probiótico *Lactococcus lactis*, contra *Aeromonas hydrophila in vitro*, así como su efecto inmunoestimulador en tilapia (*Oreochromis niloticus*). Al-Faragi y Alsaphar (2012), señalaron que el probiótico *Bacillus subtilis* aislado del contenido intestinal de ejemplares de carpa común (*Cyprinus carpio*) podría inhibir también el crecimiento de *Aeromonas hydrophila*, tras un periodo de 24 h.

La suplementación dietética con *Bacillus licheniformis*, aumentó el crecimiento, la respuesta inmune y la resistencia a las enfermedades de la tilapia juvenil del Nilo (*Oreochromis niloticus*) contra *Streptococcus iniae* (Han *et al.*, 2015).

Tres cepas bacterianas (*Pseudomonas psychrotolerans*, *Vibrio ichthyenteri* y *Labrenzia* sp.) aisladas del tracto gastrointestinal de dorada (*S. aurata*) mostraron actividad inhibidora frente a patógenos de peces: *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Pseudomonas anguilliseptica* (Mancuso *et al.*, 2015b).

En trucha arcoíris (*O. mykiss*), la utilización de varias cepas probióticas como *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus sakei* administrada en la dieta durante 2 semanas, activó el sistema inmune y protegió a los peces frente a enfermedades bacterianas como la lactococosis y la forunculosis, mostrando porcentajes de supervivencia entre 97-100% (Brunt *et al.*, 2007; Vendrell *et al.*, 2008).

La cepa probiótica *Vagococcus fluvialis*, aislada de peces marinos en Canarias, mostró una buena protección tras una inoculación experimental en lubinas (*D. labrax*) frente a *V. anguillarum* tras la administración de la cepa probiótica en la dieta de los peces durante 30 días, produciendo un porcentaje relativo de supervivencia del 42,3% (Sorroza *et al.*, 2012). Asimismo, una cepa probiótica de *Enterococcus gallinarum* produjo un

efecto protector moderado, con un porcentaje relativo de supervivencia de 21,7% en una infección experimental en lubina frente a *V. anguillarum* (Sorroza *et al.*, 2013).

A continuación, se recogen las cepas bacterianas más utilizadas en acuicultura, aisladas de diversas fuentes, y probadas en peces (Tabla IV).

Tabla IV.- Probióticos utilizados en peces.

CEPA PROBIÓTICA	ESPECIE	REFERENCIA
<i>Streptococcus lactis</i>	Rodaballo (<i>Psetta maxima</i>)	García de la banda <i>et al.</i> (1992)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>		
<i>Lactobacillus</i> sp.	Rodaballo (<i>Psetta maxima</i>)	Gatesoupe (1994)
<i>Carnobacterium</i> sp.		
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Salmón del atlántico (<i>Salmo salar</i>)	Austin <i>et al.</i> (1995)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Salmón del atlántico (<i>Salmo salar</i>)	Gildberg <i>et al.</i> (1995)
<i>Carnobacterium</i> sp.	Salmón del atlántico (<i>Salmo salar</i>)	Jöborn <i>et al.</i> (1997)
<i>Carnobacterium divergens</i>	Bacalao del Atlántico (<i>Gadus morhua</i>)	Gildberg <i>et al.</i> (1997)
<i>Carnobacterium divergens</i>	Bacalao del Atlántico (<i>Gadus morhua</i>)	Gildberg y Mikkelsen (1998)
<i>Bacillus megaterium</i>	Pez gato americano (<i>Ictalurus punctatus</i>)	Queiroz y Boyd (1998)
<i>Bacillus polymyxa</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>		
<i>Bacillus licheniformis</i>		
<i>Vibrio pelagius</i>	Rodaballo (<i>Psetta maxima</i>)	Ringo y Vadstein (1998)
G-probiotic	Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Ramesha (1999)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Gram <i>et al.</i> (1999)
<i>Carnobacterium</i> spp.	Salmón del atlántico (<i>Salmo salar</i>)	Robertson <i>et al.</i> (2000)

Tabla IV.- Probióticos utilizados en peces (continuación).

CEPA PROBIÓTICA	ESPECIE	REFERENCIA
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Nikoskelainen <i>et al.</i> (2001a)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Salmón del atlántico (<i>Salmo salar</i>)	Gram <i>et al.</i> (2001)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Spanggaard <i>et al.</i> (2001)
<i>Enterococcus faecium</i> SF68	Anguila (<i>Anguilla anguilla</i>)	Chang y Lui (2002)
<i>Bacillus toyoi</i>		
<i>Carnobacterium</i> spp.	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Irianto y Austin (2002)
<i>Vibrio fluvialis</i>		
<i>Aeromonas hydrophila</i>		
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Abadejo (<i>Pollachius pollachius</i>)	Gatesoupe (2002)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Tovar <i>et al.</i> (2002)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<i>Streptococcus faecium</i>	Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Lara-Flores <i>et al.</i> (2003)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Nikoskelainen <i>et al.</i> (2003)
<i>Bacillus subtilis</i>	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Raida <i>et al.</i> (2003)
<i>Bacillus licheniformis</i>		

Tabla IV.- Probióticos utilizados en peces (continuación).

CEPA PROBIÓTICA	ESPECIE	REFERENCIA
<i>Aeromonas</i> sp.	Anguila (<i>Anguilla anguilla</i>)	Lategan y Gibson (2003)
<i>Aeromonas</i> sp.	Perca plateada (<i>Bidyanus bidyanus</i>)	Lategan <i>et al.</i> (2004a,2004b)
<i>Aeromonas media</i>	Anguila (<i>Anguilla anguilla</i>)	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Panigrahi <i>et al.</i> (2004,2005)
<i>Roseobacter</i> sp.	Rodaballo (<i>Psetta maxima</i>)	Hjelm <i>et al.</i> (2004)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Carnevali <i>et al.</i> (2004)
<i>Lactobacillus fructivorans</i>		
<i>Bacillus circulans</i>	Rohu (<i>Labeo rohita</i>)	Ghosh <i>et al.</i> (2004)
<i>Aeromonas sobria</i>	Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Brunt y Austin (2005)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Aubin <i>et al.</i> (2005)
<i>Saccharomyces boulardii</i>		
<i>Micrococcus</i> sp.		
<i>Vibrio</i> sp.		
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Solea senegalensis</i>	Chabrillón <i>et al.</i> (2005)
<i>Roseobacter</i> sp.	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Makridis <i>et al.</i> (2005)
<i>Cytophaga</i> sp.		

Tabla IV.- Probióticos utilizados en peces (continuación).

CEPA PROBIÓTICA	ESPECIE	REFERENCIA
<i>Lactobacillus delbrüeckii</i>	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Salinas <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus subtilis</i>		
<i>Shewanella</i> sp.		
<i>Paracoccus</i> sp.		
<i>Aeromonas</i> sp.		
<i>Micrococcus</i> sp.	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Chabrilón <i>et al.</i> (2006)
<i>Vibrio</i> sp.		
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Carnevali <i>et al.</i> (2006)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Vendrell <i>et al.</i> (2008)
<i>Lactobacillus plantarum</i>		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Balcázar <i>et al.</i> (2007)
<i>Lactobacillus sakei</i>		
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Reyes-Becerril (2008)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Capkin y Altinok (2009)
<i>Bacillus mojavenensis</i>		
<i>Lactobacillus</i> sp.	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Suzer <i>et al.</i> (2008)
<i>Bacillus circulans</i>	Catla (<i>Catla catla</i>)	Bandyopadhyay y Das Mohapatra (2008)

Tabla IV.- Probióticos utilizados en peces (continuación).

CEPA PROBIÓTICA	ESPECIE	REFERENCIA
<i>Enterococcus</i> sp.	Bacalao del Atlántico (<i>Gadus morhua</i>)	Lauzon <i>et al.</i> (2010)
<i>Arthrobacter</i> sp.		
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Perca de río (<i>Perca fluviatilis</i>)	Gobeli <i>et al.</i> (2009)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Epinephelus coioides</i>	Son <i>et al.</i> (2009)
<i>Kocuria</i> SM1	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Sharifuzzaman y Austin (2010)
<i>Shewanella</i> spp.	Lenguado senegalés (<i>Solea senegalensis</i>)	García de la Banda <i>et al.</i> (2010)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Ferguson <i>et al.</i> (2010)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Tovar <i>et al.</i> (2010)
<i>Alteromonas</i> sp. (Pdp11)	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Varela <i>et al.</i> (2010)
<i>Bacillus</i> sp.	Mero de pintas naranjas (<i>Epinephelus coioides</i>)	Sun <i>et al.</i> (2010)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Esturión persa, (<i>Acipenser persicus</i>), Beluga (<i>Huso huso</i>)	Askarian <i>et al.</i> (2011)
<i>Lactobacillus curvatus</i>		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Pérez <i>et al.</i> (2011b)

Tabla IV.- Probióticos utilizados en peces (continuación).

CEPA PROBIÓTICA	ESPECIE	REFERENCIA
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Rohu (<i>Labeo rohita</i>)	Giri <i>et al.</i> (2011)
<i>Bacillus subtilis</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>	Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	Al-Faragi y Alsaphar (2012)
<i>Vagococcus fluvialis</i>	Lubina europea (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Sorroza <i>et al.</i> (2012)
<i>Enterobacter sp.</i>	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	LaPatra <i>et al.</i> (2014)
<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp 11	Lenguado senegalés (<i>Solea senegalensis</i>)	Tapia-Paniagua <i>et al.</i> (2014)
<i>Bacillus subtilis</i>	Rohu (<i>Labeo rohita</i>)	Thankappan <i>et al.</i> (2014)
<i>Bacillus aerophilus</i>		
<i>Bacillus firmus</i>		
<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Mancuso <i>et al.</i> (2015b)
<i>Vibrio ichthyenteri</i>		
<i>Labrenzia sp.</i>		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Migral (<i>Cirrhinus mrigala</i>)	Dutta y Ghosh (2015)
<i>Bacillus sonorensis</i>		
<i>Bacillus stratosphericus</i>	Migral (<i>Cirrhinus mrigala</i>)	Mukherjee <i>et al.</i> (2016)
<i>Bacillus aerophilus</i>		
<i>Bacillus licheniformis</i>		
<i>Solibacillus silvestris</i>		
<i>Solcilibalus silvestris</i>		

Tabla IV.- Probióticos utilizados en peces (continuación).

CEPA PROBIÓTICA	ESPECIE	REFERENCIA
<i>Bacillus subtilis</i>	Rohu (<i>Labeo rohita</i>)	Banerjee <i>et al.</i> (2016)
<i>Enterococcus hirae</i>	Catla (<i>Catla catla</i>)	Adnan <i>et al.</i> (2017)
<i>Bacillus pumilus</i>	Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Srisapoomee y Areechon (2017)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Van Doan <i>et al.</i> (2018)
<i>Bacillus velezensis</i>		

III.4.- SISTEMA INMUNE EN TELEÓSTEOS

El sistema inmune engloba múltiples componentes con distintas capacidades que se combinan entre sí para proteger frente a las enfermedades (Gómez y Balcázar, 2008). El sistema inmunológico de los peces es similar fisiológicamente al de los vertebrados superiores, aunque con ciertas diferencias (Uribe *et al.*, 2011), y puede mejorar con la ayuda de los probióticos, prebióticos y/o la combinación de ambos, los simbióticos (Verschuere *et al.*, 2000).

El sistema inmune de los peces presenta dos tipos de respuesta, la innata y la adquirida:

- Sistema inmune innato (inespecífico o natural)

La respuesta inmune innata o sistema de defensa no específico, constituye la primera barrera defensiva de los peces frente a los patógenos (Nayak *et al.*, 2010a), al detectar y eliminar los patógenos invasores de forma inmediata y no específica (Kelly y Salinas, 2017). Lo integran componentes celulares, humorales y la barrera física, formada por la piel, el moco, las escamas, y las branquias (Magnadottir, 2010).

Entre los parámetros humorales innatos se encuentran la lisozima, los péptidos antimicrobianos, los componentes del complemento, las antiproteasas, la transferrina, las pentraxinas, las lectinas y los anticuerpos naturales (Gómez y Balcázar, 2008).

Los parámetros celulares están formados por las células citotóxicas inespecíficas y fagocitos (monocitos, macrófagos y neutrófilos) (Gómez y Balcázar, 2008). Las células encargadas de la inmunidad innata son capaces de reconocer estructuras moleculares de los patógenos, incluyendo los polisacáridos, lipopolisacáridos, peptidoglicanos bacterianos, ADN, ARN viral y otras moléculas (Uribe *et al.*, 2011).

Este sistema inmune innato o inespecífico puede ser suprimido por cambios en la temperatura, el manejo, el estrés, y las altas densidades de cultivo, mientras que los aditivos alimentarios y los inmunoestimulantes pueden mejorar su eficiencia (Magnadottir, 2006; Magnadottir, 2010). Los probióticos interactúan con monocitos, macrófagos, neutrófilos y las células *Natural Killer* (NK) para mejorar la respuesta inmune innata (Nayak, 2010a). El uso de estos productos reduce la necesidad de

tratamientos terapéuticos, potencia los efectos de las vacunas y, a su vez, mejora los indicadores de producción (Uribe *et al.*, 2011).

- Sistema inmune adquirido (específico o adaptativo):

La inmunidad adquirida o respuesta inmune específica es la segunda línea de defensa de los peces, pudiendo ser una respuesta celular y/o humoral que se basa en cambios adaptativos en las poblaciones linfoides (linfocitos T y B) (Sorroza, 2012). Se dirige a antígenos específicos, conservando una memoria. Distinguiéndose la respuesta inmune humoral, cuyo factor más importante son las inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos, producidas por los linfocitos B, y la respuesta celular, mediada por linfocitos T. En teleósteos el principal anticuerpo es la IgM (Bengtén *et al.*, 2000), además, intervienen otros componentes como los neutrófilos y macrófagos, las proteínas de membrana receptoras de linfocitos T y el sistema del complemento.

Ambos sistemas inmunitarios (innato y adaptativo) se comunican a través de las citoquinas.

III.4.1. CITOQUINAS

Las citoquinas son pequeñas proteínas glicosiladas que intervienen en la señalización celular (Akhter *et al.*, 2015), y controlan la comunicación entre células diana responsables de la respuesta inmune (Savan y Sakai, 2006). Los peces secretan citoquinas análogas a la de los mamíferos (Bird *et al.*, 2006), a través de los linfocitos, granulocitos y macrófagos. Las principales familias de citoquinas son las interleuquinas (IL), el interferón (IFN), el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor estimulante de colonias de granulocitos y las quimioquinas (Savan y Sakai, 2006; Secombes *et al.*, 2009; Abo-Al-Ela, 2018).

Los peces tienen presente todas las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias claves, por lo que son capaces de producir una respuesta inflamatoria para eliminar la infección y posteriormente resolver la respuesta para prevenir un daño en el animal (Secombes, 2016). Algunos probióticos pueden modular la producción de estas citoquinas

proinflamatorias como la interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 12 (IL-12), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interferón-gamma (IFN- γ), así como con las citoquinas antiinflamatorias, como la interleuquina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante β (TGF β) en muchos organismos (Christensen *et al.*, 2002). Se ha observado que tras una suplementación dietética con probióticos, prebióticos o simbióticos, las citoquinas proinflamatorias muestran niveles de transcripción mayores (Abid *et al.*, 2013).

III.4.1.1. Interleuquinas

Su principal función es regular la activación, diferenciación o proliferación de los linfocitos, la secreción de anticuerpos, la quimiotaxis y la producción de otras citoquinas. La familia IL-1 son agentes fundamentales en la regulación de la inflamación, puede ser producida por monocitos, granulocitos, linfocitos T, macrófagos, células endoteliales, y otras células. La IL-1 β fue la primera interleuquina caracterizada en peces óseos y cartilagosos y es producida por una amplia gama de células. La caspasa-1 es la proteasa principal para procesar esta interleuquina. Las citoquinas helicoidales de tipo I incluyen la mayor parte de las interleuquinas. Se puede subdividir en la subfamilia IL-2, la subfamilia IL-6 y la subfamilia IL-12. La interleuquina 6 (IL6) favorece el desarrollo de los linfocitos B, lo que aumenta la producción de anticuerpos IgM, IgE e IgG, y tienen tanto propiedades proinflamatorias como antiinflamatorias. Por otro lado, las citoquinas α -helicoidales de tipo II incluyen la subfamilia IL-10 (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26 e IFN- γ) y los IFN de tipo I y III. La IL-10 es una citoquina antiinflamatoria que suprime las respuestas inmunes (Zou y Secombes, 2016).

III.4.1.2. Interferón (IFN)

El interferón es una glicoproteína con una actividad antiviral muy importante (Graham y Secombes, 1990). Es producido por macrófagos, linfocitos, fibroblastos y células NK, tras una infección viral o una estimulación inmune, y han sido identificados en muchas especies de peces.

Se distinguen tres clases de interferones atendiendo a sus características biológicas y estructurales: interferón α o leucocitario, interferón β o fibroblástico, e interferón γ o tipo inmune. A los interferones α y β , también se les conoce como interferones de tipo I, y a los interferones γ , como tipo II. Los IFN de tipo I poseen funciones inmunitarias, entre ellas la activación de defensas antivirales y efectos antiproliferativos, mientras que el IFN tipo II o IFN-gamma (IFN- γ), es una de las citoquinas más relevantes de la respuesta inmune en vertebrados. Sin embargo, las actividades que media dicha citoquina es un enigma en teleósteos (Pereiro *et al.*, 2019). Es producida principalmente por linfocitos T y células NK, aunque puede ser producida por otras células inmunes (Schroder *et al.*, 2003). Está implicado en diversos aspectos de la inmunidad, como la inmunomodulación, inflamación, activación de macrófagos y linfocitos T, presentación de antígenos, apoptosis, entre otras (Schoenborn y Wilson, 2007). La producción y actividad de IFN- γ está regulada por diferentes moléculas. Las interleuquina 12 (IL12), IL18 e IL-1 β , son los principales promotores de su síntesis. No obstante, también cuenta con reguladores negativos como la interleuquina 4 (IL4) e interleuquina 10 (IL10), los glucocorticoides y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Schoenborn y Wilson, 2007).

III.4.1.3 Factor de Necrosis Tumoral (TFN)

El factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) es una citoquina proinflamatoria que juega un papel clave tanto en los procesos inflamatorios como en la respuesta inmunológica (Chu, 2013). Se expresa en la etapa temprana de infección en los peces, aumentando la actividad fagocítica de leucocitos y ejerciendo una actividad proapoptótica.

Es producido por gran variedad de células: monocitos, neutrófilos, macrófagos, linfocitos T y B y células NK. Tiene gran capacidad para eliminar agentes patógenos induciendo la fagocitosis y la apoptosis. Además, es productor de otras citoquinas como las interleuquinas IL1, IL-6 y IL-8 entre otras (Tracey y Cerami., 1993).

III.4.1.4 Quimioquinas

Las quimioquinas o citoquinas quimiotácticas se han categorizado como reguladores clave en la respuesta inmune, actuando como puente entre las respuestas innatas y adaptativas. Son pequeñas proteínas que regulan la migración de las células inmunes, tanto en condiciones fisiológicas normales, como cuando existe inflamación (Alejo y Tafalla, 2011), induciendo la migración de células a sitios de infección o lesión (Laing, 2004). Se clasifican en cuatro subfamilias, atendiendo a la posición de sus residuos cisteína N-terminal: CC, CXC, C y CX3C (Peatman y Liu, 2007).

III.4.1.5 Proteína Mx:

Las proteínas Mx son GTPasas con actividad antiviral e inducibles por interferón I en respuesta a la infección por mixovirus. Sin embargo, su inducción también se debe a la presencia de otros elementos como el ARN sintético bicatenario o a las vacunas de ADN que contienen genes de especies de rhabdovirus (Acosta *et al.*, 2004). Se localizan principalmente en el citoplasma o en el núcleo celular y se presentan en más de una forma en los peces. El número de isoformas de proteína Mx difiere drásticamente entre las diferentes especies de peces, pudiendo llegar a contener exclusivamente una isoforma en muchas de las especies de peces, hasta siete, como es el caso del pez cebra (Lin *et al.*, 2006). También se ha evidenciado que algunas especies de peces como los Gadiformes y *Stylophorus chordatus* lo han perdido (Solbakken *et al.*, 2016).

III.5.- SEPSIS Y RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

La sepsis y el *shock* séptico son problemas importantes en asistencia sanitaria, que afectan a millones de personas anualmente. Su mortalidad se encuentra en torno al 25% y su incidencia se halla en incremento (García *et al.*, 2018).

En la década de los años 40 del siglo XX comenzó la utilización de antimicrobianos en la práctica clínica, y desde entonces, se han convertido en fármacos indispensables para el tratamiento de la mayoría de los procesos infecciosos causados por bacterias, tanto en las personas como en los animales. El abuso en el uso de los

antibióticos ha traído consigo la resistencia a los antimicrobianos y la aparición y diseminación de bacterias multirresistentes. Todo ello, junto con la escasez de tratamientos alternativos, es uno de los mayores problemas que debe afrontar la salud pública y la sanidad animal.

Diferentes especies de la familia *Enterobacteriaceae* son unos de los principales microorganismos responsables de las infecciones, y la resistencia de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* a cefalosporinas de tercera generación, mediada por la producción de β -lactamasas, es una problemática creciente. Aunque actualmente, la mayor amenaza es diseminación de enterobacterias productoras de carbapenemasas, enzimas capaces de inactivar los carbapenémicos, que corresponde al último escalón disponible para el tratamiento de muchas infecciones bacterianas.

La búsqueda de medidas alternativas de prevención y control de las infecciones bacterianas, tanto en salud humana como animal, es uno de esos puntos clave, que el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, a través de la Agencia Española del Medicamento, recoge en el último Plan Estratégico y de Acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos (AEMPS, 2015). Es precisamente en este punto, donde se engloba nuestro proyecto, mediante la utilización de probióticos.

La mayoría de los trabajos sobre probióticos en los últimos años, se han centrado en estudiar el efecto, que los probióticos ejercen sobre el sistema inmune de humanos y otros animales, incluidos los peces teleósteos (Llewellyn y Foey, 2017), ya que estos microorganismos son capaces de interactuar con células del sistema inmune, mejorando la respuesta inmune innata y favoreciendo la proliferación de linfocitos B (Takeda *et al*, 2006; y Takeda y Okumura, 2007). Se conocen resultados positivos mediante la utilización de bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus rhamnosus* en humanos y en otros mamíferos (Arunachalam *et al*, 2000; Khailova *et al.*, 2017), demostrándose en ratones, que este probiótico es capaz de proteger contra una neumonía experimental por *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, no hay muchos estudios experimentales o ensayos clínicos con cepas probióticas frente a la sepsis.

A decorative graphic at the top of the page featuring a blue, textured splash or wave pattern that tapers off towards the right. The text is centered within this graphic.

MATERIAL Y MÉTODOS

IV.- MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1.- AISLAMIENTO DE CEPAS PROBIÓTICAS

Para el aislamiento de las posibles cepas probióticas se muestrearon tres especies de peces con importancia en la acuicultura marina. Concretamente se utilizaron 42 lubinas (*D. labrax*), 39 corvinas (*A. regius*) y 15 lenguados (*Solea solea*). Todos los animales muestreados procedieron de mercados para consumo humano de Las Palmas de Gran Canaria, España. Por lo que habían sido previamente sacrificados por los métodos convencionales para consumo, y mantenidos adecuadamente en refrigeración hasta su adquisición y transporte hasta el laboratorio de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC).

Una vez en el laboratorio se mantuvieron las condiciones de refrigeración, salvo el tiempo preciso para realizar el trabajo de laboratorio. De cada ejemplar de pez, se tomaron muestras de agallas con un hisopo estéril y se sembraron por extensión en Agar Sangre (AS), Agar Marino (AM) y Agar Infusión Cerebro Corazón (BHIA) de la casa comercial Pronadisa (Laboratorios Conda, Madrid, España) que y fueron preparados según instrucciones del fabricante adicionando un 1% extra de cloruro sódico a los medios AS y un 1,5 % al BHIA para facilitar el crecimiento de bacterias marinas con requerimientos extras de este componente.

Una vez tomada la muestra de agalla, cada pez muestreado se sometió a una necropsia reglada para la extracción del paquete intestinal. Tras la apertura del intestino, se procedió a la recolección y homogenización de aproximadamente 1 gramo de contenido intestinal en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se realizaron diluciones seriadas (1/10 a 1/1000), y con ayuda de un asa de Digralsky se sembraron 100 µl de cada una de ellas sobre los diferentes medios de cultivo, tratando de conseguir la mayor diversidad de cepas bacterianas posibles.

Una vez realizada la siembra, se mantuvieron las placas del cultivo en estufa entre 2 y 7 días a 25°C en aerobiosis, siendo observados diariamente para comprobar indicios de crecimiento. Cada colonia con un aspecto diferente, en base a sus características

morfológicas, fue resembrada en cultivo puro en medio BHIA y mantenida en refrigeración en su medio original, así como una alícuota mantenida en congelación a -80°C en Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHIB) (Pronadisa) con un 15% de glicerol como crioprotector, y/o liofilización.

IV.2.- SELECCIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS

IV.2.1.- MECANISMOS DE ACCIÓN *IN VITRO*

IV.2.1.1.- Inhibición del crecimiento de patógenos de interés en acuicultura

La determinación del efecto inhibitorio sobre el crecimiento de diferentes patógenos de acuicultura marina y continental por parte de las cepas bacterianas aisladas de los peces es el método que permite realizar la primera preselección a partir del total de las cepas aisladas para su posterior evaluación como potenciales cepas probióticas (Austin *et al.*, 1992).

Cada cepa aislada a partir de los peces muestreados, fue enfrentada a diferentes cepas patógenas en acuicultura que forman parte de la colección de agentes patógenos del laboratorio de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología del IUSA. Las cepas patógenas empleadas (Tabla V) se cultivaron en medio BHIA adicionado con un 1% de cloruro sódico en el caso de cepas patógenas marinas, y en ausencia de este 1% de sal, para las cepas patógenas de la acuicultura continental, durante 24 h a 25°C, para obtener un cultivo en fase exponencial.

Tabla V.- Cepas patógenas en acuicultura utilizadas en la experiencia de inhibición del crecimiento de las cepas aisladas como posibles cepas probióticas.

CEPA PATÓGENA EN ACUICULTURA	ORIGEN	FUENTE	ESPECIE
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> 894T	CECT	I. W. Smith	Salmón (<i>Salmo salar</i>)
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> 895	CECT	I. W. Smith	Trucha común (<i>Salmo trutta</i>)
<i>Vibrio anguillarum</i> 975-1	IA-USC	L. Toranzo	Rodaballo (<i>Psetta máxima</i>)
<i>Vibrio anguillarum</i> 112P	IUSA	F. Real	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)
<i>Vibrio anguillarum</i> 507	IUSA	F. Real	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)
<i>Vibrio anguillarum</i> 4347	CECT	C. Esteve	Anguila (<i>Anguilla anguilla</i>)
<i>Vibrio harveyi</i> 525	CECT	Baumann et al. (1981)	Crustáceo (<i>Amphipodo</i>)
<i>Vibrio alginolyticus</i> 521	CECT	Y. Miyamoto	Jurel (<i>Trachurus trachurus</i>)
<i>Pseudomonas</i> spp.	ICCM	F. Real	Bocinegro (<i>Pargus pargus</i>)
<i>Yersinia ruckeri</i> – Zuidaire	ULe	J. Ramos	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
<i>Yersinia ruckeri</i> 3	ULe	J. Ramos	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> C2	IUSA	F. Real	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> 17911	ATCC	B. Sniezko	Perca (<i>Perca fluviatilis</i>)
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> DI-21	ATCC	L. Toranzo	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> 94/99	IUSA	F. Real	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> EP04	IUSA	F. Real	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)
<i>Streptococcus</i> spp.	ICCM	F. Real	Sama (<i>Dentex gibbosus</i>)
<i>Streptococcus iniae</i> IUSA-1	IUSA	D. Padilla	Bocinegro (<i>Pargus pargus</i>)
<i>Lactococcus garvieae</i> 102507	CIP	R. Kusuda	Trucha común (<i>Salmo trutta</i>)

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo. Universidad de Valencia

IA-USC: Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela

ICCM: Instituto Canario de Ciencias Marinas (Gobierno de Canarias)

ULe: Universidad de León

IUSA: Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria. Universidad de las Palmas de Gran Canaria

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo. Universidad Boulevard, Manassas. EEUU

CIP: Colección del Instituto Pasteur. Instituto Pasteur. Paris, Francia

Posteriormente, se realizaron suspensiones seriadas con solución salina estéril hasta conseguir una concentración aproximada de 10^9 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), calculada por espectrofotometría y posterior recuento en placa. Una vez alcanzada dicha concentración se realizan diluciones seriadas 1/10 para obtener la concentración de 10^7 UFC/ml. De esta dilución, se siembran por extensión 100 μ l en medio BHIA y AS, con ayuda de un asa de Digralsky.

Por otro lado, las cepas obtenidas de los peces como posibles cepas probióticas, se sembraron por agotamiento en medio BHIA durante 24 h a 25°C. Transcurrido el tiempo estipulado, se toma una pequeña muestra con ayuda del asa de siembra y se deposita sobre la placa con medio BHIA o AS donde se había sembrado previamente por extensión cada cepa patógena.

Las placas inoculadas con el patógeno y la cepa aislada como posible probiótico se incuban en estufa a 25°C durante 24-48 h para poder observar en caso positivo un halo de inhibición.

IV.2.1.2.- Resistencia a gradientes de pH

El objetivo de esta prueba es evaluar la capacidad de las cepas seleccionadas como posibles probióticos a resistir pH ácidos simulando la secreción ácida del tránsito gastrointestinal.

Cada cepa seleccionada se cultivó en medio BHIB a 22°C durante 24 h. Tras este periodo de incubación, se centrifugaron a 2.000 g durante 10 min y se resuspendieron en PBS estéril hasta alcanzar una concentración final de 10^{10} UFC/ml (confirmado por recuento en placa y espectrofotometría). Posteriormente, 10 μ l de cada una de las suspensiones obtenidas se depositaron por triplicado en 100 ml de PBS estéril a pH 3, 4, 5, 6 y 7 (ajustando el pH mediante solución 0,1M de HCl), incubándolo durante 90 min a 22°C. Transcurrido este tiempo se realizaron diluciones seriadas (1/10 a 1/1.000), y de cada dilución se depositaron 100 μ l sobre medio BHIA para proceder al recuento en placa del número de colonias (Nikoskelainen *et al.*, 2001b). Como control de la experiencia se utiliza la posible cepa probiótica suspendida en PBS, siendo tratadas en las mismas condiciones que las suspensiones descritas anteriormente.

IV.2.1.3.- Resistencia a las sales biliares

El objetivo de la prueba de resistencia a las sales biliares es evaluar la capacidad de las cepas seleccionadas como posibles probióticos a resistir la acción de la secreción biliar de los peces simulando el tránsito gastrointestinal de dichas cepas.

Las cepas bacterianas seleccionadas se cultivaron en medio BHIB a 22°C durante 24 h, para posteriormente centrifugarlas a 2.000 g durante 10 min, y se realizan dos lavados con PBS estéril, ajustando hasta una concentración final de 10⁷ UFC/ml. A esta concentración se le añade un 10% de bilis fresca de lubina (*D. labrax*). Para ello, utilizamos peces de unos 500 gramos a los que le extraemos la secreción biliar por punción directa en condiciones de esterilidad con aguja fina. Las suspensiones bacterianas, adicionadas con un 10% de bilis de lubina se incuban por triplicado durante 90 min a 22°C.

Transcurrido este tiempo se realizaron diluciones seriadas (1/10 a 1/1.000), y de cada dilución se depositaron 100 µl sobre medio BHIA para proceder al recuento en placa del número de colonias (Nikoskelainen *et al.*, 2001b). Como control de la experiencia se utiliza la posible cepa probiótica suspendida en PBS, siendo tratadas en las mismas condiciones que las suspensiones descritas anteriormente.

IV.2.1.4.- Competición por nutrientes mediante co-cultivo

Para determinar la competencia por nutrientes, se realizó la prueba de crecimiento en co-cultivo. Consiste en cultivar conjuntamente las cepas candidatas a probióticas con los patógenos frente a los que se ha evidenciado inhibición. Se ha seguido la metodología descrita por Nikoskelainen *et al.* (2001b).

Se cultivaron cepas potencialmente probióticas y las patógenas durante 18 h en caldo de tripticaseína de soja (TSB).

Se centrifugaron a 2000 g durante 10 min, realizando dos lavados con PBS estéril. La suspensión bacteriana se ajustó por espectrofotometría a 0.5 absorbancia a 600 nm. Después se mezclan 100 µl de cada suspensión bacteriana (probiótico y patógeno) en 1 ml de medio TSB y se incuban a 22°C durante 48 h y se realizan diluciones seriadas en

PBS estéril y se depositan en placa en medio TSA (Agar Trypticaseína de Soja). Se determina mediante el recuento en placa y como control positivo se cultiva la cepa patógena con 100 µl de PBS estéril en el mismo volumen de medio TSB.

IV.2.1.5.- Hidrofobicidad celular

La determinación de la hidrofobicidad celular es una prueba que nos permite conocer la adhesión a los tejidos que presentan ciertas bacterias. Para su realización, se empleó el método descrito por Ocaña *et al.* (1999) de adhesión microbiana a hidrocarburos.

Tras cultivar las cepas candidatas a probióticos durante 18 h en BHIB, se realizan dos lavados con PBS estéril hasta obtener una suspensión bacteriana con una absorbancia de 0,4-0,6 (DO₆₀₀), adicionando 2,4 ml de esta suspensión con 600 µl de xileno. Posteriormente se mezcla la solución con vórtex vigorosamente durante 90 segundos y se deja reposar estáticamente durante 30 min hasta que se pueda apreciar la separación en dos fases, la orgánica y la acuosa. Una vez transcurre el tiempo estimado se retira la fase acuosa (inferior) cuidadosamente evitando que se mezclen las mismas, se transfieren a tubos limpios y se mide su absorbancia a la misma longitud de onda que se utilizó al comienzo (600nm).

El porcentaje de hidrofobicidad se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$H = \left[\frac{\text{DO inicial} - \text{DO final}}{\text{DO inicial}} \right] \times 100$$

Una vez obtenido el resultado se clasifica de la siguiente forma:

- Hidrofobicidad alta (71-100%)
- Hidrofobicidad media (36-70%)
- Hidrofobicidad baja (0-35%)

IV.2.1.6.- Adhesión de las bacterias al mucus intestinal y cutáneo

La adhesión y posterior colonización del mucus intestinal, es un mecanismo importante de defensa frente a los patógenos invasores. Para llevar a cabo esta prueba, se aisló mucus intestinal y cutáneo de lubina sana de 400 gramos aproximados de peso corporal. Todo el mucus se centrifugó dos veces a 12.000 g durante 5 min para eliminar el material particulado y celular. Posteriormente se ajustó a 0,5 mg/ml de proteína en PBS mediante el método de Bradford. El porcentaje de adherencia al mucus intestinal y cutáneo se evaluó siguiendo la metodología descrita por Etyemez y Balcázar (2016). A continuación, se depositaron 100 µl de cada mucus (intestinal y cutáneo) en placas de poliestireno durante toda la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron dos veces con PBS estéril y se adicionaron 100 µl de una suspensión bacteriana de cada cepa potencialmente probiótica a una concentración de 10⁹ UFC/ml en PBS y se incubaron durante 1 hora a 22°C. Las placas se lavaron y para liberar las bacterias que quedaban unidas a la placa de poliestireno, se añadió Triton X-100 (Thermo Scientific™) al 0,5% a cada pocillo durante 5 min.

La adhesión se expresó como el porcentaje de bacterias recuperadas después de la adhesión en relación con el número de bacterias añadidas inicialmente a cada pocillo.

IV.2.1.7.- Crecimiento de las cepas en el mucus intestinal y cutáneo

El mucus intestinal y cutáneo aislado de la lubina se diluyó en PBS estéril hasta una concentración final de proteína de 0,5 mg/ml utilizando el kit de análisis de proteína Bradford (Sigma). Posteriormente, se agregaron 3 ml de mucus diluido a 10 µl de suspensión de un cultivo nocturno en TSB de cada cepa potencialmente probiótica, que fue lavada dos veces con PBS estéril, y se incubó a 22°C durante 22 h en una incubadora con agitación.

Las mismas cepas probióticas se cultivaron en TSB y PBS, y se utilizaron como control positivo y negativo respectivamente. Transcurrido el periodo de incubación se realizó recuento en placa (TSA) tras la realización de diluciones seriadas (1/10 - 1/10.000) en PBS estéril (Olsson *et al.*, 1992).

IV.2.1.8.- Producción de sustancias antibacterianas

Una vez seleccionadas las cepas con evidencia de efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las diferentes cepas patógenas en acuicultura, se realizó el análisis de la producción de sustancias antibacterianas que nos permite evaluar si el efecto inhibitorio que se ha observado es debido a sustancias extracelulares que produce la bacteria durante su crecimiento.

Para esta prueba se ha seguido la metodología descrita por Nikoskelainen *et al.* (2001b) con pequeñas modificaciones descritas por Kim y Austin (2008). Las cepas potencialmente probióticas se cultivaron en BHIB durante 24 h a 22°C, se centrifugaron a 2000 g durante 10 min y los sobrenadantes se esterilizaron a través de filtros de 0,45 µm de tamaño del poro y se liofilizaron mediante un liofilizador Telstar (Cryodos-50) durante 24 h. El sobrenadante liofilizado se resuspendió en 100 µl de PBS (concentrado 10 veces) para enfrentarlo contra las cepas patógenas seleccionadas. Las cepas patógenas se cultivaron en BHIB durante la noche y se transfirieron uniformemente a placas TSA. Posteriormente, se agregaron 10 µl de muestra liofilizada a una serie de pocillos realizados mediante punción en el medio de cultivo con pipeta Pasteur estéril, observándose la zona de inhibición después de la incubación durante 24 h.

IV.2.2.- IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS

Una vez realizada la completa caracterización *in vitro* de las cepas potencialmente probióticas, fueron sometidas a identificadas mediante espectrometría de masas, MALDI-TOF (Autoflex III, Bruker Daltonics GmbH) una técnica utilizada en la identificación de microorganismos mediante la creación de un espectro basado en el perfil de proteínas, que es único para una especie en concreto (Croxatto *et al.*, 2012; Bizzini y Greub, 2010).

De manera complementaria, y como control de la identificación mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF, una de las cepas fue sometida a identificación mediante amplificación directa del gen 16S rRNA por PCR, secuenciación parcial del mismo (con lecturas en las dos direcciones) y análisis de las secuencias (Arahal *et al.*, 2008). Utilizando EzTaxon (Kim *et al.*, 2012) y el BLAST análisis (Altschul *et al.*,

1997) de las secuencias obtenidas frente a las bases de datos del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), recogiendo la extensión del fragmento solapado, el porcentaje de semejanza y el nombre del microorganismo con mayor grado de semejanza con la secuencia obtenida. Esta fase fue realizada por el servicio de identificación de la Colección Española de Cultivos Tipo de la Universidad de Valencia.

IV.2.3.- ENSAYOS *IN VIVO*

IV.2.3.1.- Determinación de la inocuidad de las cepas

El objetivo de este ensayo era comprobar la inocuidad de las cepas seleccionadas como posibles cepas probióticas, entendiéndose como inocuidad la capacidad de no producir daño al hospedador tras su administración intraperitoneal.

En esta experiencia utilizamos tres tanques de 80 litros cada uno en los cuales colocamos 10 lubinas (*Dicentrarchus labrax*) de aproximadamente 15 g de peso. Escogimos tres de las cepas potencialmente probióticas que dieron buenos resultados en las pruebas inhibición del crecimiento de patógenos realizadas anteriormente. Dichas cepas fueron cultivadas en medio BHIB a 22°C durante 24 h. Pasado este tiempo se centrifugaron a 2.000 g durante 5 min, realizándose posteriormente dos lavados con PBS estéril hasta ajustar la suspensión por espectrofotometría a una absorbancia de 1 a una longitud de onda de 600 nm y posterior recuento en placa tras incubación a 22°C durante 48 h.

La inoculación de las cepas a los peces previamente anestesiados con MS-222 (Sigma) se realizó por vía intraperitoneal, utilizando 500 µl de una suspensión bacteriana a una concentración final de 10^7 UFC/ml de cada una de las cepas seleccionadas. Por otra parte, al grupo control se le administró el mismo volumen de PBS estéril.

Una vez inoculados los peces con cada una de las cepas seleccionadas, así como el grupo control con PBS estéril, mantuvimos a los peces en observación diaria durante 20 días, en los que controlábamos el número de bajas, así como la presencia de lesiones o cualquier otro signo de enfermedad. Una vez transcurrido este período de tiempo los

peces fueron sacrificados mediante sobredosis de anestésico siendo transportados en bolsas estériles con refrigeración hasta el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología del IUSA, en donde realizamos una necropsia reglada para la observación macroscópica de lesiones internas y externas y posterior toma de muestras de hígado, bazo y riñón para su estudio microbiológico en medio BHIA durante 24 h a 22°C e histopatológico por la técnica de la Hematoxilina-Eosina.

IV.2.3.2.- Incorporación del probiótico en la dieta experimental

Las cepas que hayan obtenido los mejores resultados *in vitro* respecto a su caracterización como potenciales cepas probióticas, y que a su vez hayan mostrado su inocuidad en el ensayo anterior, serán incorporadas a la dieta de un grupo de lubinas para el análisis de su respuesta inmune mediada por citoquinas. A su vez, habrá un grupo control al que se le incorpore el probiótico *Vagococcus fluvialis* L21, ya caracterizado anteriormente por nuestro grupo de investigación. Esta cepa, *Vagococcus fluvialis* L21 fue aislada de intestino de lenguado (*Solea solea*), identificada y caracterizada en nuestro laboratorio, proponiéndose por primera vez como probiótico para acuicultura marina (Sorroza *et al.*, 2012), al mostrar excelentes resultados tanto *in vitro* como *in vivo*, protegiendo frente a la infección por *Vibrio anguillarum*. Posteriormente, se continuó con el estudio *in vitro* relacionado con el sistema inmune inespecífico, determinando el efecto inmunomodulador, la dosis efectiva, la dinámica de expresión de genes y el efecto de los productos extracelulares (ECPs) de la cepa en cuestión en leucocitos de lubina (*D. labrax*) (Román *et al.*, 2015). Por tanto, la incorporación de esta cepa probiótica en la dieta experimental nos permite continuar con la profundización y ampliación del conocimiento sobre la misma, determinando su capacidad inmunomoduladora *in vivo* en la expresión génica de citoquinas.

Las cepas se incorporaron a la dieta siguiendo la metodología descrita por Irianto y Austin (2002). Las cepas fueron cultivadas en medio durante 24 h en estufa a 22°C. Posteriormente, se centrifugaron a 2.000 g durante 5 min. Se realizan dos lavados con PBS estéril, y se ajusta la suspensión a 10¹⁰ UFC/ml. 20 ml de esa suspensión fue adicionada a 120 g de pienso comercial Skretting (Burgos, España) por pulverización y se procede a secar en estufa a 25°C durante un día entero y posteriormente se mantiene

en refrigeración. Para confirmar la supervivencia de las cepas adicionadas en el pienso, se realizan análisis del pienso diarios, recolectando 1 g del pienso que se suspende en PBS estéril y recuento en placa en medio BHIA.

Para esta experiencia en la que se estudiará la expresión de citoquinas relacionadas con la respuesta inmune inducida por administración de las cepas potencialmente probióticas en la dieta, se utilizaron 160 lubinas de 20g de peso aproximadamente, y 8 tanques de 80 litros de capacidad, con aireación constante y fotoperiodo natural (12 h), que se distribuyeron de la siguiente manera:

- 3 tanques destinados para la dieta experimental para cada una de las cepas potencialmente probióticas a analizar.
- 3 tanques para la dieta experimental con la cepa *Vagococcus fluvialis* L21.
- 2 tanques de grupo control, alimentados sin probióticos.

Los peces fueron alimentados diariamente durante un periodo de 30 días, y transcurrido este tiempo, se continuó alimentando a todos los grupos con la dieta comercial Skretting sin adición de cepas bacterianas probióticas.

Se realizaron muestreos a los 15 días de la administración de la dieta, el día 30, y una semana posterior (día 37), seleccionando 2 ejemplares por grupo y periodo, en los que se recogieron muestras de bazo, hígado y riñón. Una vez finalizada la experiencia, los peces resultantes fueron sacrificados mediante sobredosis anestésica (2-fenoxietanol) e inmersión en hielo, y trasladados al laboratorio de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC).

IV.2.3.3.- Extracción de ARN

Se realizaron extracciones de ARN de las muestras obtenidas de los peces tras la administración de la dieta con probióticos. Para ello se utilizó un kit comercial de extracción RNeasy Mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y acorde a la naturaleza de nuestras muestras.

IV.2.3.4.- Transcripción inversa

Se realiza la transcripción inversa para convertir el ARN extraído anteriormente a ADNc. Para ello se empleó el kit comercial de Bio-Rad (iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR).

El primer paso es ajustar el ARN a una concentración de 0,1 µg/µl. Posteriormente se toman 2 µl de ARN y se mezcla con 5 µl de tampón 10X y 12 µl de agua DEPC, ambos incluidos en el kit y se incuban durante 10 min a 70 ° C.

Una vez finalice la incubación, volvemos a mantener las muestras en refrigeración y le añadimos la enzima transcriptasa inversa que será la encargada de construir la cadena complementaria de ARN, junto con 5 µl de agua DEPC y se incuba de la siguiente manera:

- 25°C durante 10 min
- 42°C durante 50 min
- 70°C durante 15 min
- 16°C ∞

IV.2.3.5.- Expresión génica mediante PCR a tiempo real (qPCR)

Se utilizó la PCR a tiempo real para conocer la expresión de genes tras la adición de probióticos en la dieta. Los genes estudiados han sido: Interleucina-1β (IL-1β), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 10 (IL-10), Caspasa 3 (Casp-3), Factor de Necrosis Tumoral (TNF-α), Ciclooxygenasa 2 (COX-2) y Mx. Los cebadores que se han utilizado se recogen en la siguiente tabla:

Tabla VI.- Secuencias de cebadores utilizados para la qPCR Y T^a de hibridación.

GEN	SECUENCIA DE CEBADORES	T ^a HIBRIDACIÓN	FUENTE
B-actina	Forward 5'ATGTGGATCAGCAAGCAGG-3'	57,7°C	AJ537421 Genne runer
	Reverse 5'AGAAATGTGTGGTGTGGTCG-3'		
IL-1 β	Forward 5'-ATTACCCACCACCCACTGAC-3'	57,7°C	AJ269472 Genne runer
	Reverse 5'-TCTCTTCCACTATGCTCTCCAG-3'		
IL-6	Forward 5'-ACTTCCAAAACATGCCCTGA-3'	59,3°C	AM490062 (Sepulcre <i>et al.</i> , 2007)
	Reverse 5'- CCGCTGGTCAGTCTAAGGAG-3'		
IL-10	Forward 5'-ACCCCGTTCGCTTGCCA-3'	59,3°C	AM268529 (Picchietti <i>et al.</i> , 2009)
	Reverse 5'-CATCTGGTGACATCACTC-3'		
Casp-3	Forward 5'-ACGAAGCAGGTCAATCATCC-3'	59,3°C	DQ345774 Genne runer
	Reverse 5'-GCAGTTTAAGGGTATCCAGAGC-3'		
TNF- α	Forward 5'-GCCAAGCAAACAGCAGGAC-3'	60°C	DQ200910 Genne runer
	Reverse 5'-ACAGCGGATATGGACGGTG-3'		
COX-2	Forward 5'-AGCACTTCACCCACCAGTTC-3'	59,3°C	AJ630649 (Sepulcre <i>et al.</i> , 2007)
	Reverse 5'-AAGCTTGCCATCCTTGAAGA-3'		
Mx	Forward 5'-GGTCAAGGAGCAGATCAAACAG-3'	57,7°C	AM228974 Genne runer
	Reverse 5'-CTCGCATCAGGTTAGGGAATC-3'		

El ensayo de qPCR de las muestras obtenidas de hígado, bazo y riñón de los peces alimentados con la dieta con probióticos (*Vagococcus fluvialis* y *Alcaligenes faecalis subp faecalis-1*) y grupos controles (alimentados sin probióticos), fue realizado en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín de Las Palmas de Gran Canaria, España. Para ello se utilizó el termociclador LightCycler® de Roche (versión 4.1), y se amplificó cada muestra en capilares con volumen total de 25 μ l, adicionando 2 μ l de ADNc, 12 μ l de SYBR Green Supermix (Biorad), 0,5 μ l de cada uno de los cebadores (forward y reverse), y 10 μ l de agua ultrapura. El protocolo seguido se recoge en la siguiente tabla:

Tabla VII.- Protocolo de ciclos de qPCR para expresión de los genes.

PROGRAMA	CICLOS	MODO DE ANÁLISIS	Tª/T
Desnaturalización	1	-	95°C / 5'
Ciclos	40	Cuantificación	95°C / 15'' 60°C / 30'' 72°C / 30'' (X1)
Melting	1	Curva Melting	95°C / 1' 70°C / 1' 55°C / 30'' 95°C (Rampa: 0,1C°/s, continuo)
Enfriamiento	1	-	37°C

Se recogieron muestras de los animales en tres periodos: a los 15 días desde el comienzo con la dieta experimental, el día 30, que corresponde al último día en la que se administra la dieta probiótica, y una semana después de haber finalizado con la administración de la misma.

Las cuantificaciones genómicas se determinaron en base al valor del ciclo umbral (Ct) registrado en el software (LightCycler® ROCHE, versión 4.1) en donde se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Con el método comparativo CT, también conocido como como el $2^{-\Delta\Delta Ct}$ método, se presentan los datos del gen de interés en relación con algún calibrador o gen de control interno. Un método ampliamente utilizado para presentar la expresión relativa de los genes, ideado por Kenneth Livak y Thomas Schmittgen en 2001. De tal modo que:

$$1) \Delta Ct = Ct \text{ Gen Interés} - Ct \text{ Housekeeping } (\beta\text{-actina})$$

$$2) \Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct \text{ Grupo Control}$$

$$3) 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

IV.3.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO EXPERIENCIAS PECES

Todos los ensayos se hicieron por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante el modelo general univariante y la validación de método se hizo comprobando la normalidad de los datos mediante la homogenización de la varianza ($P < 0,05$). Todos estos parámetros fueron examinados mediante el paquete estadístico SPSS para Windows versión 27.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). Los datos de las reacciones de qPCR recopilados en el termociclador para cada uno de los genes estudiados, fueron tratados con Excel y analizados posteriormente con el software señalado, y para el análisis estadístico se realizó un análisis de la varianza de dos vías (ANOVA) y un test de *Tukey*.

IV.4 EXPERIENCIA: PROTECCIÓN FRENTE A PERITONITIS FECALOIDE

Esta experiencia fue aprobada por el Comité Local de Ética Animal, del Hospital Universitario de Gran Canaria, Dr. Negrín. El uso de animales y los procedimientos experimentales han seguido las recomendaciones de la Comisión Europea (2010/63/UE) así como las que se recogen en la legislación española (Ley 53/2013), que establece los principios básicos para la protección de los animales con fines científicos.

IV.4.1.- ALOJAMIENTO DE LOS ANIMALES

Para la realización de este ensayo se utilizaron 42 ratas macho Crl:Sprague-Dawley®(SD) de 12 semanas de edad, con un peso aproximado de 275 g. Los animales fueron criados en el estabulario del servicio de experimentación Animal de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. Los roedores fueron una tercera generación de una colonia original de Charles River (Barcelona, España).

Las ratas se alojaron emparejadas en cubetas mini aislador estándar de 1500 cm² (Tecniplast, Buguggiate, Italia), con unas dimensiones de 48 x 37,5 x 21 cm y fueron alimentados con dieta en pellets (Teklad® Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet®, Harlan, España). Tanto la alimentación como el agua potable (Fonteide®, S/C de Tenerife, España) estaba disponible *ad libitum* para los animales. Como material de cama se utilizó viruta hipoalérgica de álamo y abeto (Lignocel ¾-S®, Harlan, España).

Además, para el enriquecimiento ambiental, las ratas recibieron tejidos de celulosa y tubos de PVC rojos translúcidos, y el cambio de jaula se realizó dos veces por semana. El ciclo de luz/oscuridad fue de 12/12, la temperatura ambiente se mantuvo a $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa fue de $55\pm 5\%$ con una tasa de intercambio de aire de 15 veces/h.

Todas las ratas se aclimataron durante 21 días y se determinó su estado óptimo de salud en base a exámenes físicos individuales, y se determinó que estuvieran libres de patógenos mediante un cribado microbiológico rutinario de acuerdo con las recomendaciones europeas (Nicklas *et al.*, 2002).

IV.4.2.- INOCUIDAD Y COLONIZACIÓN

Este estudio experimental se dividió en dos fases. La primera fase fue determinar la inocuidad de la cepa mejor candidata como cepa potencialmente probiótica en acuicultura, *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1, así como las condiciones de colonización en rata. Para ello, se utilizaron 30 ratas sanas, alojadas en pareja y divididas de forma aleatoria en 6 grupos:

I. Sanas (controles negativos-1):

- Evaluadas a los 7 días (HC7), n = 5
- Evaluadas a los 15 días (HC15), n = 5
- Evaluadas a los 30 días (HC30), n = 5

Evaluadas después de la primera dosis de agua corriente.

II. Grupos tratados con la cepa probiótica (controles positivos-1):

- Grupo tratado con *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 y evaluado 7 días después de la primera dosis de probióticos (HA7), n = 5,
- Grupo tratado con *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 y evaluado 15 días después de la primera dosis de probióticos (HA15), n = 5
- Grupo tratado con *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 y evaluado 30 días después de la primera dosis de probióticos (HA30), n = 5.

Las ratas pertenecientes a los grupos HA7, HA15 y HA30 recibieron la cepa probiótica *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1 en el agua de bebida (Fonteide®) durante siete días consecutivos. La concentración utilizada fue de 6×10^8 UFC/ml de un cultivo fresco de 18 horas de incubación a 37 °C de *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1 en medio TSA enriquecido con un 5% de sangre desfibrinada de cordero (Becton Dickinson & Company). Simultáneamente, a estos animales se les administró (mediante sondaje orogástrico) 2 mililitros de la misma suspensión bacteriana cada 48 horas durante los primeros 7 días. Los animales del grupo HC (controles negativos-1) también recibieron, mediante sondaje orogástrico, el mismo volumen de agua de bebida sin probióticos. Los frascos con la suspensión bacteriana o solo con agua de bebida fueron repuestos diariamente.

IV.4.3- PROTECCIÓN FRENTE A LA PERITONITIS FECALOIDE EN RATAS

En este segundo ensayo con ratas, el objetivo era evaluar la actividad probiótica de la cepa seleccionada frente a una infección por *E. coli* utilizando un modelo clásico de peritonitis fecaloide en rata. En este ensayo se dividieron aleatoriamente a 12 animales en dos grupos:

I. Grupo Control Infectado (IC) n = 6

A este grupo no se le administró la cepa probiótica, solamente agua de bebida a través de sondaje orogástrico cada 48 h y durante 7 días y se indujo posteriormente una infección peritoneal. Los animales supervivientes fueron sacrificados humanitariamente, como se explica en el punto IV.4.4, el día 7 tras la realización de la infección experimental.

II. Grupo tratado con la cepa probiótica e infectado (IA) n = 6

A este grupo se le administró la cepa probiótica seleccionada durante 7 días consecutivos, tal y como se ha descrito anteriormente, induciéndose posteriormente una infección peritoneal. Los animales supervivientes fueron sacrificados humanitariamente al día 7 (IA7) tras la realización de la infección experimental.

Para la inducción de la infección peritoneal o peritonitis (grupos IA e IC) utilizamos el modelo clásico de infección de la cavidad peritoneal, descrito previamente (Buras *et al.*, 2005; Uzunkoy *et al.*, 2012; Shukla *et al.*, 2014). La cepa inoculada se trata de una cepa de *E. coli* aislada previamente de la microbiota intestinal de rata Sprague Dawley sana, criadas en el animalario del servicio de investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.

La concentración administrada fue de 2×10^8 UFC/animal por vía intraperitoneal (ip) con una aguja de 25G, en la esquina inferior derecha del abdomen del animal. Los inóculos procedían de un cultivo fresco de 18 horas de incubación a 37°C de *E. coli* en medio TSA enriquecido con un 5% de sangre de ovino desfibrinada que se resuspendió en solución salina estéril al 0,9%. Tras la inoculación, la analgesia consistió en 0,05 mg/kg de buprenorfina cada 12 horas por vía subcutánea (Buprex®, Mundipham, Limburg, Alemania) durante los 3 días posteriores a la infección experimental.

Tanto en el ensayo IV.4.2 para determinar la inocuidad de la cepa probiótica en ratas, como en este modelo clásico de peritonitis fecaloide en rata, y siguiendo las recomendaciones de algunos autores como Acred *et al.* (1994) y Nemzek *et al.* (2004), los animales fueron evaluados cada 12 horas conforme a los signos recopilados en la siguiente tabla (Tabla VIII), aplicándose criterios de valoración humanitarios de acuerdo con las recomendaciones del autor (Nemzek *et al.*, 2004).

Tabla VIII.- Puntuación de la prueba de protección contra roedores.

SIGNOS VITALES	
1. Pelo erizado	6. Ataxia
2. Pérdida de peso	7. Temblor
3. Secreción ocular	8. Hipotemia
4. Letargia	9. Cianosis
5. Postura encorvada	
Condiciones	Acción sugerida
5 + 6 (o 7 u 8 o 9)	Eutanasia

Fuente: Adaptado de Acred *et al.* (1994)

IV.4.4.- TEMPERATURA CORPORAL, PESO Y RECOGIDA DE MUESTRAS.

Al final de cada fase experimental (séptimo día después de la inoculación con *E. coli*, o al séptimo, decimoquinto y trigésimo día en animales no infectados) se pesaron los animales supervivientes, se midió su temperatura corporal en el área perianal utilizando para ello un termómetro digital infrarrojo (T-One®. CA-MI srL, Italia) y, finalmente, anestesiados con una combinación de medetomidina (Domtor, Orion Pharma®, Finlandia)/ fentanilo (Fentanest®, KERN Pharma, España) a una dosis de 0,3/0,3 mg/kg vía subcutánea.

Cuando los animales alcanzaron un plano quirúrgico anestésico, se recolectaron las siguientes muestras:

- I. Sangre venosa de la vena yugular externa (4 ml), para la realización posterior de hemograma y bioquímica.
- II. Sangre intracardíaca (4 ml), para la realización posterior de hemocultivo y recogida de suero.
- III. Orina por punción directa en la vejiga urinaria con aguja 25G (2 ml), para la realización posterior de urocultivo.
- IV. Lavado broncoalveolar del pulmón derecho (2-3 ml), para la realización posterior de cultivo microbiológico.
- V. Hígado, riñón, bazo, duodeno, páncreas, yeyuno, ganglios linfáticos mesentéricos, timo y pulmón para la realización de estudios histológicos mediante la técnica de la hematoxilina-eosina.

Finalmente, las ratas fueron sacrificadas confirmándose la muerte mediante exanguinación tras cortar la vena cava caudal y la arteria aorta descendente.

IV.4.5.- HEMOGRAMA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

Tras la eutanasia de los animales, se les realizó una necropsia y se tomaron muestras de sangre de cada uno de ellos (0,3 ml). Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena cava craneal de las ratas supervivientes, que fueron anestesiadas

intraperitonealmente con una combinación de diazepam y ketamina. Para ello se utilizó una aguja estéril 20G, introduciendo 1-2 pulgadas en el abdomen desinfectado del animal. Posteriormente, se introdujeron 15 ml de solución salina estéril en la cavidad abdominal y se procedió a masajear la zona.

Los parámetros hematológicos (hematocrito, glóbulos rojos, plaquetas, glóbulos blancos totales y diferenciados en linfocitos, monocitos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos) se contaron en muestras de sangre entera en EDTA K3, en un autoanalizador de hematología Cell-Dyn Sapphire (Abbott Laboratories®, Chicago. EE. UU.).

Las determinaciones de parámetros bioquímicos séricos como alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), creatinina (CREA), nitrógeno ureico en sangre (BUN) y bilirrubina total (TBIL) se realizaron en un analizador modular Cobas 8000 Series (Roche Diagnostics®, Basilea. Suiza) utilizando la sangre venosa. La sangre obtenida por punción cardíaca se centrifugó y el suero se recogió y almacenó a -80°C.

Ambos equipos se utilizaron después de una cuidadosa y exhaustiva validación para su uso en muestras de ratas.

IV.4.6.- RECUEENTOS BACTERIANOS EN HECES

Para determinar la capacidad de supervivencia de la cepa probiótica inoculada en el intestino de rata, así como su influencia en el crecimiento de *E. coli* a partir de microbiota fecal, se procedió a la determinación de UFC/g de heces de ambas especies bacterianas.

En todos los grupos experimentales, las heces se recolectaron directamente del recto de los animales mediante masaje abdominal. Las muestras se tomaron al inicio de cada experimento y al final de los diferentes tiempos experimentales.

Para determinar las cargas bacterianas se realizaron diluciones seriadas diluciones (1/10, 1/100, y 1/1000) en solución salina estéril al 0,9% y se sembraron 20 µl de cada

suspensión en media BHIA, adicionando 45 g/l de cloruro sódico), 0,064 g/l de vancomicina (Laboratorios SALA. Barcelona, España) y 0,02 g/l de Azul de Bromotimol (MERCK. Darmstadt, Alemania).

Tras la incubación a 37°C en aerobiosis, durante 24h (*E. coli*) y 72h (probiótico), se calcularon los recuentos totales viables de las muestras originales (UFC/g de heces). Se separaron y aislaron diferentes colonias 2-3 veces, y se identificaron las especies bacterianas basándonos en la morfología de las colonias y mediante tinción de Gram, así como la técnica MALDI-TOF descrita previamente.

IV.4.7.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO (ORINA, SANGRE Y LAVADO BRONCOALVEOLAR:

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio en un plazo de tiempo dentro de las 2 h posteriores a la recolección. Para analizar microorganismos aeróbicos, se cultivaron 100 µl de orina, sangre y lavado broncoalveolar de cada animal en 10 ml de medio BHIB, se incubaron durante la noche a 37°C, posteriormente se sembraron 25 µl de dichos cultivos en Agar cistina-lactosa deficiente en electrólitos o CLED (PanReac-AppliChem. Darmstadt, Alemania), Agar MacConkey, Agar Manitol Salado (PanReac-AppliChem. Darmstadt, Alemania) y Agar Dextrosa Sabouraud (PanReac-AppliChem. Darmstadt, Alemania) y se volvieron a incubar durante 24 horas a 37°C. Las especies bacterianas se identificaron mediante la morfología colonial, tinción de Gram y mediante la técnica MALDI-TOF.

Para analizar los microorganismos anaeróbicos, se cultivaron 100 ml de sangre en 10 ml de Medio Fluido de Tioglicolato (BBL, Becton Dickinson) y se incubaron a 37°C durante 7 días. Si se detectaba algún signo de crecimiento durante este periodo de tiempo, se realizaba un subcultivo en placas de Agar Sangre, Agar Chocolate (CHOC) y Agar McConkey (McK) que se incubaban durante 48 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y en placas de Agar anaerobio Brucella y Agar Bilis Esculina Bacteroides (BBE), incubadas durante 4 días a 37°C en anaerobiosis.

Tras realizar la esternotomía, los pulmones se expusieron para realizar un lavado broncoalveolar a través de una cánula de 1,2 mm de diámetro interno, que fue insertada

en la tráquea. El lavado líquido (5 ml) se inyectó lentamente en los pulmones con una jeringa estéril y posteriormente fue recuperado mediante succión suave para tratar de evitar daños en los tejidos. Este procedimiento fue repetido cuatro veces. El contenido recolectado se colocó en un tubo estéril para su posterior análisis microbiológico.

El cráneo de los animales fue cuidadosamente disecado, y pequeñas muestras de meninges fueron removidas bajo condiciones de esterilidad y depositándolo en un tubo estéril para el análisis microbiológico.

Muestras biológicas de sangre, orina, fluido peritoneal, lavado broncoalveolar y meninges fueron recolectados en todos los grupos experimentales al final de los ensayos bajo anestesia general. La sangre (2 ml) se extrajo de la vena yugular: se colocó 1 ml en un tubo EDTA K3 para el estudio hematológico, y el otro ml se colocó en un tubo de hemocultivo (BD Bactec Peds Plus / F viales de cultivo, Becton Dickinson). Además, de 4 a 5 ml de sangre se recogieron punzando el corazón a través del diafragma, y, después de la centrifugación a 3.000 g durante 10 minutos, el suero se congeló y se almacenó a una temperatura de -80°C.

La vejiga fue perforada para recoger la orina, y posteriormente se depositó en un recipiente estéril para su análisis microbiológico. También se recuperó a través de la laparotomía, líquido peritoneal para estudiarlo microbiológicamente.

IV.4.8.- EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

Las muestras de los órganos fueron fijadas en formalina al 4% durante 24 horas, embebidas en parafina y cortadas en secciones de 4 μ para su estudio histológico. Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina y eosina y se examinaron al microscopio óptico. Cada portaobjetos fue evaluado por dos patólogos expertos que desconocían los grupos experimentales. En todos los órganos se evaluó la presencia de bacterias en el interior de los vasos (observación microscópica de émbolos bacterianos azules en el interior de los vasos, constituidos por pequeñas formas de varillas), desorganización parenquimatosa, formación de edema intersticial, infiltración de leucocitos, necrosis tisular y hemorragia intersticial. La lesión pulmonar se determinó en función de los signos previos, así como del engrosamiento de los tabiques alveolares y la pleuritis. Se determinó el daño cardíaco

si la respuesta inflamatoria estaba presente en el epicardio y/o el miocardio. Se evaluó también el daño intestinal a nivel mucoso y seroso con la determinación de la respuesta inflamatoria.

La lesión peritoneal se determinó en función de la puntuación de gravedad de la peritonitis histopatológica (Uzunkoy *et al.*, 2012). Evaluándose con puntuaciones de 0, 1, 2 y 3, de acuerdo con los hallazgos que se muestran en la (Tabla IX):

Tabla IX.- Puntuación histopatológica de la peritonitis.

PUNTUACIÓN PERITONITIS	CRITERIOS DE PUNTUACIÓN DE LOS RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS
0	Sin signos de inflamación o alteración tisular
1	Dilatación de los capilares subserosos, opacidad de la superficie peritoneal e inflamación de las células mesoteliales
2	Película delgada de fibrina exudativa y descamación focal de las células mesoteliales, menos de 10 leucocitos por campo 60X
3	Exudación extensa de fibrina y descamación difusa de las células mesoteliales, más de 10 leucocitos por campo de 60X o microabscesos focales

Fuente: Adaptado de Uzunkoy *et al.* (2012)

IV.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO EXPERIENCIAS CON RATAS

Los datos en cifras se expresan como diagramas de caja y bigotes (Box-Whisker). Los datos de las tablas se expresan como medianas y valores de percentiles 25 y 75. Las comparaciones entre dos grupos independientes se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. Las comparaciones entre múltiples grupos se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples cuando fue necesario. Las correlaciones se calcularon mediante la prueba rho de Spearman. También se utilizó regresión lineal múltiple y, debido al pequeño tamaño de la muestra, se complementó con bootstrapping. Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico R versión 3.5.3 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria). Todas las pruebas fueron de dos colas y se consideró la significancia estadística cuando el valor de p era $<0,05$.

A decorative graphic at the top of the page featuring a blue, textured splash or wave effect that tapers towards the center.

RESULTADOS

V.- RESULTADOS

V.1.- CEPAS OBTENIDAS EN LOS MUESTREOS

Tras la obtención de las muestras de agallas y el procesado del contenido intestinal de los diferentes ejemplares de las especies muestreadas, obtuvimos un total de 156 cepas, de las cuales 65 cepas fueron aisladas de lubina (*D. labrax*), 57 de corvina (*A. regius*) y 34 de lenguado común (*S. solea*), para su posterior caracterización *in vitro* como posibles cepas probióticas.

En la (Tabla X) se muestra en el origen de las cepas preseleccionadas una vez caracterizadas como posibles cepas probióticas en base a su efecto inhibitorio de patógenos, resistencia a pH ácidos y a la acción de la bilis cuyos resultados serán detallados a continuación.

Tabla X.- Fuente de las cepas preseleccionadas como posibles cepas probióticas.

Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)		Corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)		Lenguado (<i>Solea solea</i>)			
AGALLA	INTESTINO	AGALLA	INTESTINO	AGALLA	INTESTINO		
A6L	I3L	A11C	I1C	A1LE	I2LE		
A2L		A12C	I2C		I3C	I5LE	
					I3C		
					I4C		

V.2.- RESULTADOS DE LAS PRUEBAS *IN VITRO* DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS PRESELECCIONADAS

V.2.1.- INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE PATÓGENOS DE INTERÉS EN ACUICULTURA

Tras el enfrentamiento de cada una de las 156 cepas aisladas tras los muestreos, un total de 48 mostraron efecto inhibitorio frente al menos una de las cepas patógenas de la acuicultura marina y/o continental analizadas Sin embargo, sólo 12 cepas mantuvieron dicho efectos tras las conservación y manipulaciones repetidas en el laboratorio (Tabla XI). De todas ellas, la cepa A12C es la única que muestra un efecto inhibitorio contra todos los patógenos probados.

Tras ella, las cepas potencialmente probióticas que mayor número de resultados positivos mostraron fueron: I3C inhibiendo a *Vibrio harveyi* CECT 525, *V. anguillarum* 112P, *V. anguillarum* 507, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* CECT 894T, *Yersinia ruckeri* 3 y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* EP04. Por otro lado, la cepa I2LE produjo inhibición del crecimiento de *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* CECT 895, *V. anguillarum* 975-1, *V. anguillarum* CECT 4347, *V. alginolyticus* CECT 521, *Yersinia ruckeri* 3 y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* EP04.

La cepa A6L presentó efecto inhibitorio frente a tres cepas patógenas del género *Vibrio*, las cepas *V. harveyi* CECT 525, *V. anguillarum* 112P y *V. anguillarum* 507, así como frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* EP04. Asimismo, la cepa potencialmente probiótica I5LE, desarrolló halo de inhibición cuando se enfrentó a las cepas *V. anguillarum* 975-1 y *V. anguillarum* CECT 4347. Esta última cepa patógena (*V.anguillarum* CECT 4347) también fue inhibida por las cepas A1LE, A2L e I2C.

Por otro lado, las cepas probióticas I1C, I4C, e I3L mostraron únicamente efecto inhibitorio frente a *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* CECT 895. Finalmente, la cepa potencialmente probiótica A11C inhibió a las cepas patógenas *Streptococcus iniae* IUSA-1 y *Lactococcus garvieae* 102507.

Tabla XI.- Inhibición del crecimiento frente a diferentes patógenos para la acuicultura.

CEPA PATÓGENA	CEPA PROBIÓTICA											
	A6L	A11C	A12C	I3C	I2LE	A2L	A11LE	I4C	I2C	I3L	I1C	I5LE
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> CECT 894T	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> CECT 895	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
<i>Vibrio anguillarum</i> 975-1	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Vibrio anguillarum</i> 112P	+		+	+	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Vibrio anguillarum</i> 507	+		+	+	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Vibrio anguillarum</i> CECT 4347	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>Vibrio harveyi</i> CECT 525	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio alginolyticus</i> CECT 521	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia ruckeri</i> – Zuideire	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia ruckeri</i> 3	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> C2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> 17911	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> DI-21	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> 94/99	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> EP04	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i> spp.	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus iniae</i> IUSA-1	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus garvieae</i> 102507	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

RESULTADOS

En las Figuras 2 y 3 podemos observar la inhibición del crecimiento de algunos de los patógenos analizados al ser enfrentadas a nuestras cepas potencialmente probióticas.

Figura 2.- Inhibición del crecimiento de las cepas A11C y frente al patógeno *Streptococcus iniae* IUSA-1

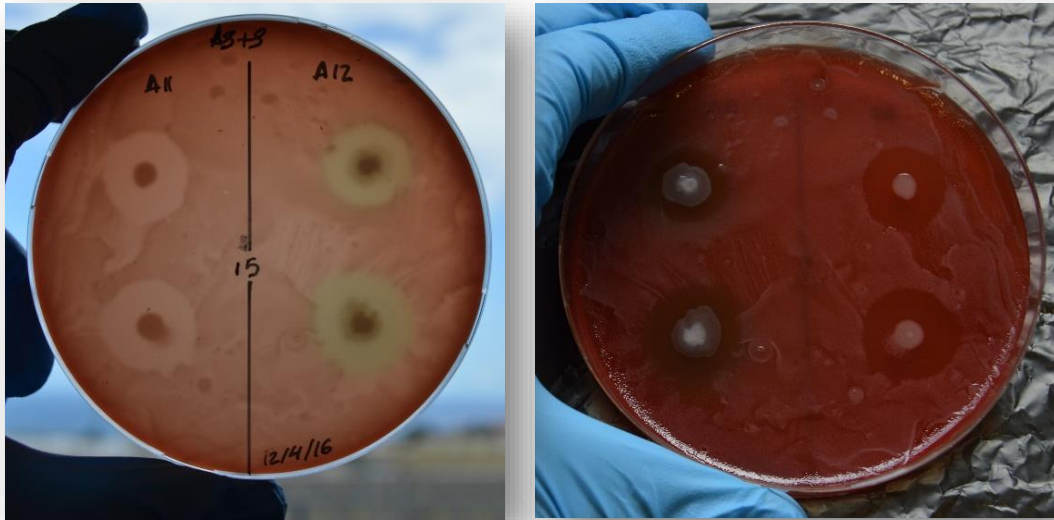
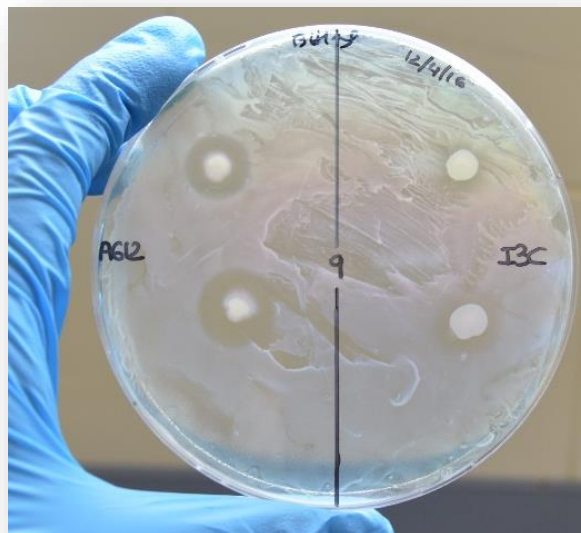


Figura 3.- Inhibición del crecimiento de las cepas A12C e I3C frente al patógeno *Yersinia ruckeri* 3



V.2.2. Identificación de las cepas probióticas preseleccionadas

En la (Tabla XII) se muestra la identificación mediante el sistema MALDI-TOF de aquellas cepas preseleccionadas como potenciales cepas probióticas en función de los resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de crecimiento de cepas patógenas en acuicultura seleccionadas.

Tabla XII.- Identificación de las cepas potencialmente probióticas mediante MALDI-TOF.

CEPA	IDENTIFICACIÓN
A11C	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
A12C	<i>Alcaligenes faecalis</i> subp. <i>faecalis</i> -1
A1LE	<i>Proteus penneri</i> -1
A2L	<i>Proteus penneri</i> -2
A6L	<i>Alcaligenes faecalis</i> subp. <i>faecalis</i> -2
I1C	<i>Proteus penneri</i> -3
I2C	<i>Lactobacillus kefir</i>
I3C	<i>Pseudomonas viridiflava</i>
I4C	<i>Pseudomonas veronii</i>
I3L	No identificada
I2LE	<i>Alcaligenes faecalis</i> subp. <i>faecalis</i> -3
I5LE	<i>Shewanella putrefaciens</i>

Como control de la técnica MALDI-TOF en la identificación de las cepas potencialmente probióticas de nuestro ensayo, la cepa con mejores resultados *in vitro* como posible cepa probiótica, A12C, fue sometida a su vez a identificación mediante amplificación directa por PCR del gen 16S rRNA, cuyo resultado mostramos en la (Tabla XIII). Como observamos, la cepa A12C, identificada por el sistema MALDI-TOF como *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis* presentó una semejanza del 99,7% sobre la secuencia tipo de esa misma especie, corroborando así la identificación mostrada por el sistema MALDI-TOF de ésta, y del resto de las cepas identificadas por este sistema.

Tabla XIII.- Identificación de la cepa A12C mediante secuenciación parcial del gen 16S por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

ESPECIE	SEMEJANZA	SECUENCIA (CEPA TIPO)
<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	1007/1010pb (99,7%)	AJ242986 (DSM 13975T)

V.2.3.- Producción de sustancias antibacterianas

Se realizó este ensayo utilizando los patógenos frente a los que se produjo halo inhibitorio al enfrentarlos con cada una de las cepas potencialmente probióticas probadas. Sin embargo, sólo las cepas *Shewanella putrefaciens* y *Lactobacillus kefir* mostraron una zona de inhibición alrededor del pocillo con sobrenadante de BHIA no neutralizado frente a *V. anguillarum*.

Sin embargo, con el sobrenadante neutralizado, únicamente la cepa *Shewanella putrefaciens* presentó una zona de inhibición en el medio. Esto quiere decir, que la producción de sustancias antibacterianas en dicha cepa (*Shewanella putrefaciens*) podría deberse a la presencia de sustancias de otra naturaleza diferente a los ácidos, en contraposición a la cepa *Lactobacillus kefir*, cuyo halo de inhibición mostrado podría deberse a la presencia de los mismos.

V.2.4.- Resistencia a gradientes de pH

En la (Tabla XIV) se recogen los porcentajes de supervivencia de las 12 cepas preseleccionadas como potenciales cepas probióticas en un gradiente de pH. Se puede comprobar cómo a medida que disminuye el pH hasta valores cercanos a 4 se produce una reducción en la viabilidad mostrada por cada cepa.

Así, encontramos que a pH 7 todas las cepas mantienen una viabilidad del 100% (control), a pH 6 la cepa *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 es la que mayor tasa

supervivencia presenta (91,6%), seguida por las cepas *Proteus penneri*-1(89,5%), *Pseudomonas viridiflava* (85,7%), *Proteus penneri* -3 (84,1%), *Shewanella putrefaciens* (81,4%) y *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-3 (81,3%). Las cepas restantes, *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-2, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus penneri*-2, *Pseudomonas veronii*, *Lactobacillus kéfir* e I3L mostraron un porcentaje de supervivencia en torno al 70%.

A pH 5, la cepa que presenta una mayor viabilidad sigue siendo la cepa *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 con un 74,3%, mientras que *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-2 es la que se afectada en mayor medida, presentando una supervivencia del 41,5%.

A pH 4 y 3 se reduce considerablemente la viabilidad de las cepas seleccionadas, siendo la cepa *Proteus penneri* -1 la más resistente en medios ácidos, al contrario de lo que le ocurre con las cepas *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-2 y *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-3, que son las que mayor susceptibilidad presentan a valores bajos de pH.

Tabla XIV.- Porcentaje de supervivencia ($\bar{X} \pm s$), de las cepas seleccionadas como potenciales cepas probióticas en diferentes valores de pH 3-7.

CEPAS PROBIÓTICAS	pH 7	pH 6	pH 5	pH 4	pH 3
<i>Alcaligenes faecalis subpfaecalis-2</i>	100	71,8*±2,2	41,5*±3,5	25,2*±2,7	4,9* ±1,8
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	73,6* ±9,9	56,4*±9,9	39,9*±15,3	7,1* ±1,2
<i>Alcaligenes faecalis subpfaecalis-1</i>	100	91,6±3,3	74,3*±4,5	50,4*±10,6	6,3* ±3,8
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	100	85,7±3,5	65,5*±1,2	55,6*±0,8	11,54*±0,9
<i>Alcaligenes faecalis subpfaecalis-3</i>	100	81,3±8,0	62,5*±3,2	43,6*±2,6	2,9*±0,2
<i>Proteus penneri-2</i>	100	74,1*±4,4	69,6*±2,9	43,0*±2,0	18,8*±1,8
<i>Proteus penneri-1</i>	100	89,5 ±3,3	72,7*±2,0	66,5*±3,5	63,5*±3,0
<i>Pseudomonas veronii</i>	100	75,6±3,7	72,2*±3,5	54,8*±3,0	41,8*±1,9
<i>Lactobacillus kefir</i>	100	75,4±5,0	70,9*±2,5	61,18*±1,7	13,5*±4,0
I3L	100	77,8±2,9	73,8*±3,1	63,53*±1,9	26,4*±2,5
<i>Proteus penneri-3</i>	100	84,1±3,7	71,7*±1,5	62,77*±2,5	18,5*±3,0
<i>Shewanella putrefaciens</i>	100	81,4±2,5	65,4*±3,4	35,52*±2,5	11,1*±1,3

*Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de cada una de las cepas comparadas con el control (100% supervivencia).

V.2.5.- RESISTENCIA A LA BILIS

Como observamos en la (Tabla XV), la bilis extraída de las lubinas utilizadas en esta experiencia afecta de forma diferente a cada cepa potencialmente probiótica analizada, mostrando valores muy diversos en función de la misma. En líneas generales, se reduce de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) la supervivencia de las cepas seleccionadas como potenciales cepas probióticas tras 90 min de contacto con la bilis comparados con control (100% de supervivencia sin bilis), a excepción de las cepas *Proteus penneri-1* (99,2%), *Pseudomonas veronii* (97,8%) y *Alcaligenes*

faecalis subsp. *faecalis*-1 (95,7%). La cepa más susceptible a la acción de la bilis es la cepa *Pseudomonas fluorescens*, presentando una tasa de supervivencia del 1,8 %.

Tabla XV- Porcentaje de supervivencia en bilis de lubina ($\bar{X} \pm s$) de las cepas seleccionadas como potenciales cepas probióticas.

CEPAS PROBIÓTICAS	% SUPERVIVENCIA EN BILIS
<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp <i>faecalis</i> -2	38,4*±4,8
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1,8*±2,5
<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp <i>faecalis</i> -1	95,7±3,6
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	46,6*±8,1
<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp <i>faecalis</i> -3	63,2*±13,4
<i>Proteus penneri</i> -2	42,5*±3,2
<i>Proteus penneri</i> -1	99,2±0,9
<i>Pseudomonas veronii</i>	97,8±1,6
<i>Lactobacillus kefir</i>	66,4*±2,5
I3L	83,6*±4,3
<i>Proteus penneri</i> -3	33,1*±4,8
<i>Shewanella putrefaciens</i>	30,9*±6,8

*Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de cada una de las cepas comparadas con el control (100% supervivencia).

V.2.6.- COMPETICIÓN POR NUTRIENTES MEDIANTE CO-CULTIVO

En la (Tabla XVI) observamos el porcentaje de reducción de la viabilidad de las cepas patógenas en co-cultivo comparado con el crecimiento del patógeno en ausencia de la cepa probiótica (reducción de su viabilidad del 0%). Podemos observar que en todas las cepas patógenas analizadas se produjo una reducción en su viabilidad tras 24 h de incubación enfrentadas a las cepas potencialmente probióticas seleccionadas. La cepa patógena cuya viabilidad resultó más afectada fue *V. anguillarum* 4347, evidenciándose

RESULTADOS

una reducción en su viabilidad de 78% en co-cultivo cuando fue enfrentada a la cepa potencialmente probiótica *Proteus penneri* -2. Por otro lado, las cepas *Alcaligenes faecalis* subp *faecalis*-1, *Shewanella putrefaciens* y *Lactobacillus kefir* también vieron afectadas gravemente en su viabilidad con reducciones superiores al 60%. Por el contrario, fue la cepa *Alcaligenes faecalis* subp *faecalis*-3 fue la que menos se vio afectada, al solo verse reducida en un 8,8%.

La cepa probiótica *Alcaligenes faecalis* subp *faecalis*-1 redujo aproximadamente el 40% de la viabilidad de la cepa patógena *Vibrio alginolyticus* 521. El resto de las cepas probióticas enfrentadas en co-cultivo con las cepas del género *Vibrio* provocaron una disminución en el crecimiento de las mismas en un rango inferior al 30%.

Tabla XVI.- Efecto de las cepas probiótica sobre el crecimiento de diferentes cepas patógenas del género *Vibrio* seleccionadas en co-cultivo.

CEPA PROBIÓTICA	% REDUCCIÓN VIABILIDAD EN CO-CULTIVO ($\bar{X} \pm S$)					
	1	2	3	4	5	6
<i>Alcaligenes faecalis</i> subp <i>faecalis</i> -2	-	14,7±6,8	11,8±2,4	-	1,16±0,8	-
<i>Alcaligenes faecalis</i> subp <i>faecalis</i> -1	18,9±2,4	21,2±5,8	12,3±5,0	60,1±14,6	4,88±1,8	40,2±5,1
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	-	27,2±1,1	29,4±3,8	-	18,0±0,7	-
<i>Alcaligenes faecalis</i> subp <i>faecalis</i> -3	28,8±14,5	-	-	8,8±2,4	-	12,4±4,8
<i>Shewanella putrefaciens</i>	20,8±1,8	-	-	77,5±12,2	-	-
<i>Lactobacillus kefir</i>	-	-	-	71,9±6,0	-	-
<i>Proteus penneri</i> -1	-	-	-	16,8±5,9	-	-
<i>Proteus penneri</i> -2	-	-	-	78,0±2	-	-

* Porcentaje de reducción de la viabilidad de las cepas patógenas en co-cultivo comparado con el crecimiento del patógeno en ausencia de la cepa probiótica (100%).

1.- *V.anguillarum* 975-1

2.- *V.anguillarum* 112P

3.- *V.anguillarum* 507

4.- *V.anguillarum* 4347

5.- *V.harveyi* 525

6.- *V.alginolyticus* 521

V.2.7.- HIDROFOBICIDAD CELULAR

En la siguiente tabla (Tabla XVII) se recogen los resultados de hidrofobicidad de las 12 cepas preseleccionadas. Siete de dichas cepas probióticas poseen capacidad hidrofóbica, siendo la cepa *Shewanella putrefaciens* la que presenta un valor mayor (86,1%), seguido de *Pseudomonas viridiflava* (79%). Por otra parte, las cepas *Pseudomonas viridiflava* (79%), *Alcaligenes faecalis subsp faecalis-1* (38,1%), *Pseudomonas fluorescens* (56,6%) y *Alcaligenes faecalis subsp faecalis-2* (68,0%) presentan un porcentaje de hidrofobicidad media, mientras que *Lactobacillus kefir* (22,2%) e I3L (cepa no identificada) (33,4%) tienen una hidrofobicidad celular baja. El resto de las cepas se consideran hidrofílicas, ya que el resultaron negativas en dicho ensayo.

Tabla XVII.- Porcentaje de hidrofobicidad ($\bar{X} \pm s$) de las 12 cepas probióticas preseleccionadas.

CEPA PROBIÓTICA	% HIDROFOBICIDAD ($\bar{X} \pm s$)
<i>Alcaligenes faecalis subsp faecalis-1</i>	38,1 ± 14,10
<i>Proteus penneri-2</i>	-58,1 ± 15,2
<i>Shewanella putrefaciens</i>	86,1 ± 2,1
<i>Alcaligenes faecalis subsp faecalis-3</i>	-4,3 ± 1,0
<i>Pseudomonas veronii</i>	-5,5 ± 1,6
<i>Proteus penneri-3</i>	-72,0 ± 21,3
<i>Lactobacillus kefir</i>	22,2 ± 3,8
I3L	33,4 ± 11,0
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	79 ± 10,5
<i>Proteus penneri-1</i>	-31,5 ± 11,2
<i>Alcaligenes faecalis subsp faecalis-2</i>	68,0 ± 3,1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	56,6 ± 13,9

V.2.8.- ADHESIÓN AL MUCUS INTESTINAL Y CUTÁNEO

En la prueba de adherencia (Tabla XVIII), es la cepa *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-3 la que presenta mayor adherencia tanto en el mucus intestinal (16,8%) como en el mucus cutáneo (26%), seguida de la cepa *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1, con una adherencia del 9,6% en el mucus cutáneo y de 8,5% en mucus intestinal. El resto de cepas han mostrado una adherencia media inferior al 10% en ambos ensayos, siendo la cepa I3L (cepa no identificada) la que menor adherencia presenta en mucus de piel (0,75%) y la cepa *Shewanella putrefaciens* en el mucus intestinal (1,1%).

Tabla XVIII.- Porcentaje de adhesión ($\bar{X} \pm s$) de las doce cepas preseleccionadas al mucus cutáneo e intestinal de lubina.

CEPA PROBIÓTICA	ADHESION MUCUS (%) ($\bar{X} \pm s$)	
	MUCUS PIEL	MUCUS INTESTINO
<i>Alcaligenes faecalis subpfaecalis-2</i>	3,3 ± 0,1	2,6 ± 0,5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,5 ± 1,1	2,5 ± 0,1
<i>Alcaligenes faecalis subpfaecalis-1</i>	9,6 ± 0,1	8,5 ± 0,6
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	9,1 ± 0,1	4,4 ± 0,4
<i>Proteus penneri-1</i>	1,5 ± 0,3	5,8 ± 0,8
<i>Alcaligenes faecalis subpfaecalis-3</i>	26 ± 3,4	16,8 ± 3,6
<i>Proteus penneri-2</i>	6 ± 1,0	2,4 ± 1,2
<i>Shewanella putrefaciens</i>	5,8 ± 1,2	1,1 ± 0,1
<i>Proteus penneri-3</i>	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,0
<i>Lactobacillus kefir</i>	7,7 ± 0,1	4,2 ± 0,4
I3L	0,7 ± 0,0	8,4 ± 0,9
<i>Pseudomonas veronii</i>	4,6 ± 1,0	1,4 ± 0,3

V.2.9.- CRECIMIENTO EN MUCUS INTESTINAL Y CUTÁNEO

Tras el periodo de incubación de todas las cepas a 22°C, en el control negativo del ensayo (PBS), todas las cepas están en el rango 10^7 UFC/ml mientras que en el control positivo (TSB) las tasas oscilan entre 10^9 y 10^8 UFC/ml. En el ensayo de crecimiento con mucus, todas las cepas probadas tienen la capacidad de utilizar el mucus de lubina como fuente de nutrientes, tanto el aislado de la piel del animal como del intestino, produciendo un crecimiento significativo a las 22 h de incubación con incrementos superiores de 1 y 2 logaritmos respecto al control negativo con PBS (10^7 UFC/ml)

Con respecto al crecimiento en mucus intestinal, destacan las cepas *Proteus penneri*-1 ($8,93 \times 10^9$ UFC/ml) y la cepa *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 ($5,83 \times 10^9$ UFC/ml) con respecto al control en PBS.

En cuanto al mucus cutáneo, vuelve a ser la cepa potencialmente probiótica *Proteus penneri* -1 la que ha experimentado mayor crecimiento, con un valor de ($5,04 \times 10^9$ UFC ml⁻¹), posteriormente *Pseudomonas fluorescens* ($4,17 \times 10^9$ UFC/ml) y *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-2 ($4,19 \times 10^9$ UFC/ml).

Tabla XIX.- Crecimiento de las 12 cepas probióticas en mucus intestinal y cutáneo de lubina, (expresado en UFC/ml) tras 22 h de incubación.

CEPA PROBIÓTICA	ADHESIÓN MUCUS ($\bar{X} \pm s$)			
	MUCUS		CONTROLES	
	INTESTINO	PIEL	TSB	PBS
<i>Alcaligenes faecalis subpfaecalis-2</i>	3,33 x 10 ⁹	4,19 x 10 ⁹	1,48 x 10 ⁹	6,00x10 ⁷
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3,98 x 10 ⁹	4,17 x 10 ⁹	4,25 x 10 ⁹	1,00x10 ⁷
<i>Alcaligenes faecalis subpfaecalis-1</i>	5,83 x 10 ⁹	3,33 x 10 ⁹	2,83 x 10 ⁹	2,33x10 ⁷
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	3,50 x 10 ⁹	2,93 x 10 ⁹	4,47 x 10 ⁹	3,33x10 ⁷
<i>Proteus penneri-1</i>	8,93 x 10 ⁹	5,04 x 10 ⁹	8,73 x 10 ⁹	2,33x10 ⁷
<i>Alcaligenes faecalis subpfaecalis-3</i>	2,01 x 10 ⁹	2,15 x 10 ⁹	1,48 x 10 ⁹	2,33x10 ⁷
<i>Proteus penneri-2</i>	1,08 x 10 ⁹	1,30 x 10 ⁹	8,33 x 10 ⁸	1,25x10 ⁷
<i>Shewanella putrefaciens</i>	1,46 x 10 ⁹	1,91 x 10 ⁹	1,06 x 10 ⁹	1,00x10 ⁷
<i>Proteus penneri-3</i>	1,06 x 10 ⁹	1,13 x 10 ⁹	4,73 x 10 ⁸	1,00x10 ⁷
<i>Lactobacillus kéfir</i>	9,17 x 10 ⁸	1,21 x 10 ⁹	8,96 x 10 ⁸	1,42x10 ⁷
I3L	1,06 x 10 ⁹	1,23 x 10 ⁹	9,54 x 10 ⁸	1,22x10 ⁷
<i>Pseudomonas veronii</i>	1,56 x 10 ⁹	1,36 x 10 ⁹	1,05 x 10 ⁹	1,17x10 ⁷

V.4.- ENSAYOS *IN VIVO*

V.4.1.- INOCUIDAD DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS PRESELECCIONADAS

Este ensayo de inocuidad se realizó con las 3 cepas que mostraron mejores resultados en las pruebas laboratoriales como cepas potencialmente probióticas, especialmente en el ensayo de inhibición del crecimiento de los patógenos. Las cepas seleccionadas fueron *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1, *Shewanella putrefaciens* y *Pseudomonas viridiflava*. Durante el período de observación de los peces inoculados con la cepa *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1, no se apreciaron signos de enfermedad en los peces inoculados. Sin embargo, en el lote de peces inoculados con la cepa *Shewanella putrefaciens* se produjeron dos bajas en un lote de 10 animales, y los peces que sobrevivieron a la inoculación experimental mostraron un comportamiento anormal. En el caso de la cepa *Pseudomonas viridiflava*, todos los animales (10) perdieron la vida tras su administración vía intraperitoneal. En la necropsia de los peces no se evidenciaron lesiones macroscópicas en ninguno de los animales sacrificados o muertos durante el ensayo de inocuidad con las 3 cepas utilizadas en este ensayo. En el estudio microbiológico, únicamente observamos un crecimiento positivo en los 2 peces muertos que fueron inoculados con la cepa *Shewanella putrefaciens*, pero la cepa recuperada no se correspondía con la cepa *Shewanella putrefaciens* inoculada, por lo que no podemos concluir que esta sea la causante de la muerte de los peces. No obstante, la cepa *Pseudomonas viridiflava* resultó responsable de la muerte de los animales al ser aislada a partir de diferentes órganos internos de los peces.

V.4.2.- CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

Se determinó la expresión génica tras la administración de la dieta experimental con los probióticos: *Vagococcus fluvialis* L21 y *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1, al ser la cepa con los mejores resultados *in vitro* respecto a su caracterización como potencial cepa probiótica, así como la cepa *Vagococcus fluvialis* L21, ya caracterizada anteriormente por nuestro grupo de investigación como cepa probiótica en lubina frente a la vibriosis.

- Expresión del gen IL-1 β :

En la Tabla (XX) y (Figura 4), se muestran los niveles de expresión del gen de la citoquina proinflamatoria IL-1 β en los diferentes órganos muestreados de lubinas (*D. labrax*) durante la experiencia de administración de la dieta probiótica con las cepas *Vagococcus fluvialis* L21 y *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1.

Como se puede observar, el día 15 de administración de la dieta, sólo se evidencia sobre-expresión del gen en las muestras de bazo del grupo de animales alimentados con la cepa *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1, en el resto de órganos del grupo, así como en los peces alimentados con la cepa *V. fluvialis* L21 existe sub-expresión con respecto al grupo control.

El día 30 (último día de administración de la dieta), observamos sub-expresión de este gen en todos los órganos analizados, tanto para la cepa *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1, como en la cepa *V. fluvialis* L21 no existe expresión de IL-1 β en ninguno de los grupos alimentados con ambas cepas probióticas.

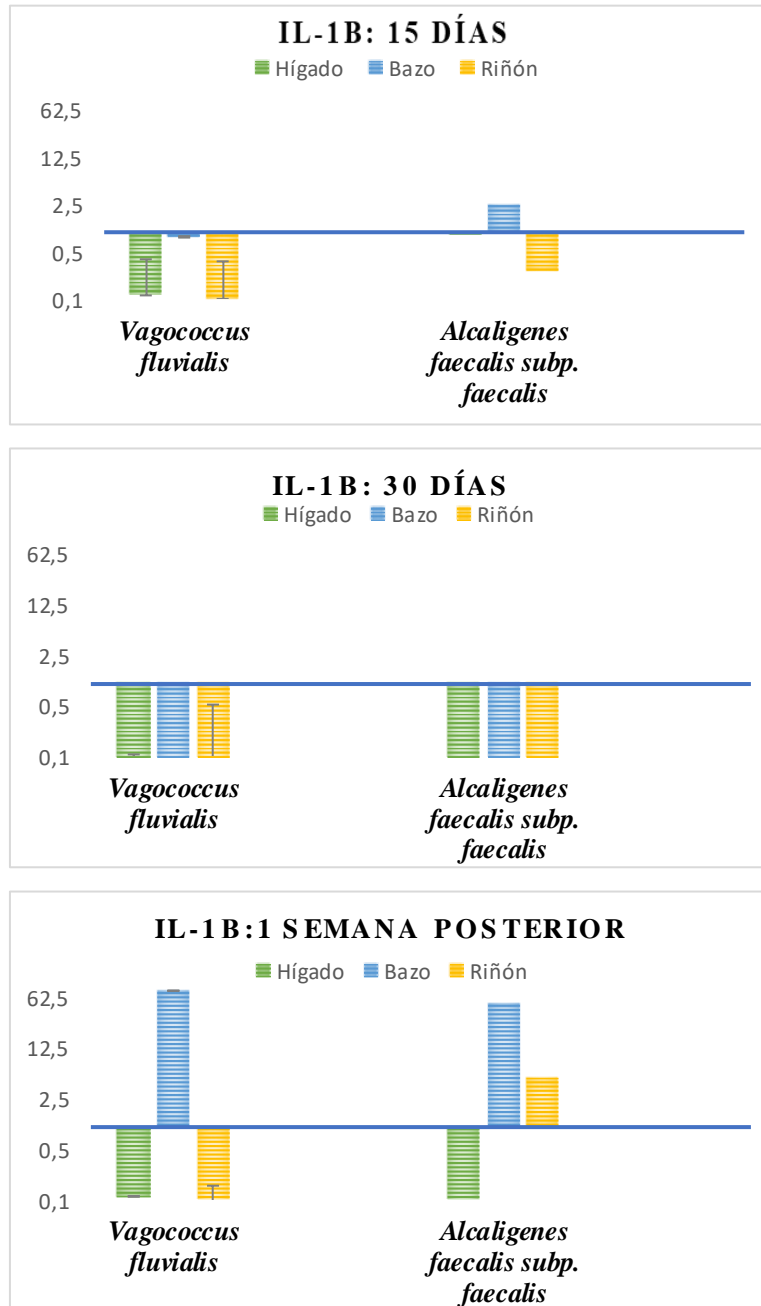
Sin embargo, una semana posterior a finalizar la administración de la dieta experimental, la expresión de la citoquina IL-1 β muestra los valores de expresión más elevados y estadísticamente significativos, en las muestras pertenecientes al bazo de ambos grupos alimentados con las cepas probióticas. Las muestras del riñón de los animales alimentados con la cepa *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1, también evidencian una sobre expresión del gen, con valores casi 4 veces superiores al grupo control. En el resto de tejidos se observa sub-expresión con respecto a dicho grupo control.

Tabla XX.-Valores de expresión de IL-1 β en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales con las cepas *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 y *Vagococcus fluvialis* L21.

	MUESTRA	<i>Vagococcus fluvialis</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>
15 días	Hígado	0,12 \pm 0,28	1 \pm 0,27
	Bazo	0,86 \pm 0,02	2,6 \pm 0,54
	Riñón	0,11 \pm 0,27	0,3 \pm 0,15
30 días	Hígado	0,001 \pm 0,11	0,004 \pm 0,0
	Bazo	0,001 \pm 0,06	0,000 \pm 0,14
	Riñón	0,004 \pm 0,52	0,001 \pm 0,08
1 semana después	Hígado	0,1 \pm 0,00	0,1 \pm 0,0
	Bazo	76,1* \pm 0,01	52* \pm 0,19
	Riñón	0,1 \pm 0,09	4,9 \pm 0,00

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al control.

Figura 4.- Expresión génica de IL-1 β en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales.



Las barras representan la desviación típica (s)

- Expresión del gen IL-6:

La cinética de expresión de la citoquina IL-6 se recoge en la (Tabla XXI) y en la (Figura 5).

A los 15 días desde el comienzo de la administración de la dieta experimental, se puede apreciar que la sobre-expresión de este gen se limita a las muestras de bazo de los animales que han sido alimentados con la cepa probiótica *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1 como ocurría con la citoquina anterior (IL-1 β). En las muestras restantes del citado grupo, así como en los animales tratados con la cepa *Vagococcus fluvialis* L21 se evidencia una sub-expresión con respecto al grupo control.

A los 30 días del experimento, la situación cambia considerablemente, en este periodo la expresión alcanza su pico máximo en las muestras de riñón de los animales alimentados con la cepa *Vagococcus fluvialis* L21, seguido por las muestras del mismo órgano, y alimentados con *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1. En el resto de muestras analizadas observamos una sub-expresión de la citoquina IL-6 con respecto al grupo control.

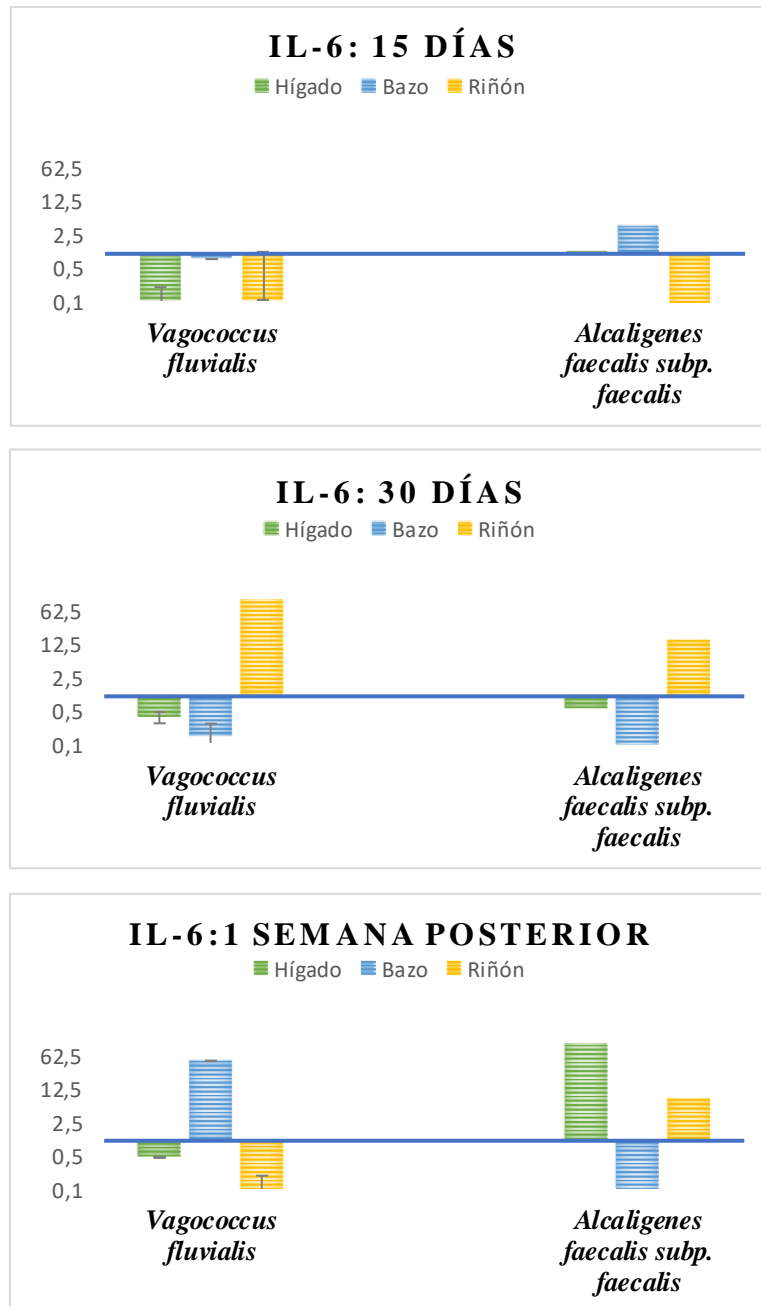
Una semana tras finalizar la dieta, se vuelve a evidenciar una sobre-expresión del gen IL-6 en el bazo de los animales tratados con *Vagococcus fluvialis* L21 y en las muestras de riñón e hígado de los animales tratados con *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1. Las muestras restantes de ambos grupos se sub-expresan con respecto al control.

Tabla XXI.- Valores de expresión de IL-6 en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales con las cepas *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 y *Vagococcus fluvialis* L21.

	MUESTRA	<i>Vagococcus fluvialis</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>
15 días	Hígado	0,1 ± 0,09	1,0 ± 0,21
	Bazo	0,8 ± 0,00	3,9 ± 0,59
	Riñón	0,1 ± 0,99	0,1 ± 0,03
30 días	Hígado	0,37 ± 0,1	0,54 ± 0,00
	Bazo	0,15 ± 0,12	0,05 ± 0,04
	Riñón	194* ± 0,51	14,5* ± 0,33
1 semana después	Hígado	0,45 ± 0,00	148,6* ± 0,11
	Bazo	46,85* ± 0,41	0,05 ± 0,00
	Riñón	0,1 ± 0,11	7,4 ± 0,00

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al control.

Figura 5.- Expresión génica de IL-6 en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales.



Las barras representan la desviación típica (s)

- Expresión del gen IL-10:

La citoquina IL-10 es la de mayor poder antiinflamatorio, y sus valores de expresión se recogen en la (Tabla XXII) y en la (Figura 6). La expresión de esta citoquina a los 15 días desde el comienzo de la dieta experimental, se limita a las muestras de hígado de los animales tratados con la cepa *Vagococcus fluvialis* L21 y las muestras de bazo del grupo de animales alimentado con la cepa *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1, expresándose en este caso, en torno 1,5 veces más que el grupo control. En el resto de las muestras observamos sub-expresión con respecto al grupo control (alimentado sin probióticos).

El día 30, se observa sub-expresión en las muestras perteneciente al hígado del grupo alimentado con la cepa *Vagococcus fluvialis* L21 y en las del bazo del grupo alimentado con la otra cepa probiótica (*Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1), al contrario de lo ocurrido en el periodo anterior (15 días). En el resto de las muestras de ambos grupos existe sobre-expresión, destacando las muestras obtenidas del riñón de los animales alimentados con la cepa *Vagococcus fluvialis* L21, que se sobre-expresa 8 veces con respecto al grupo control (alimentado sin probióticos).

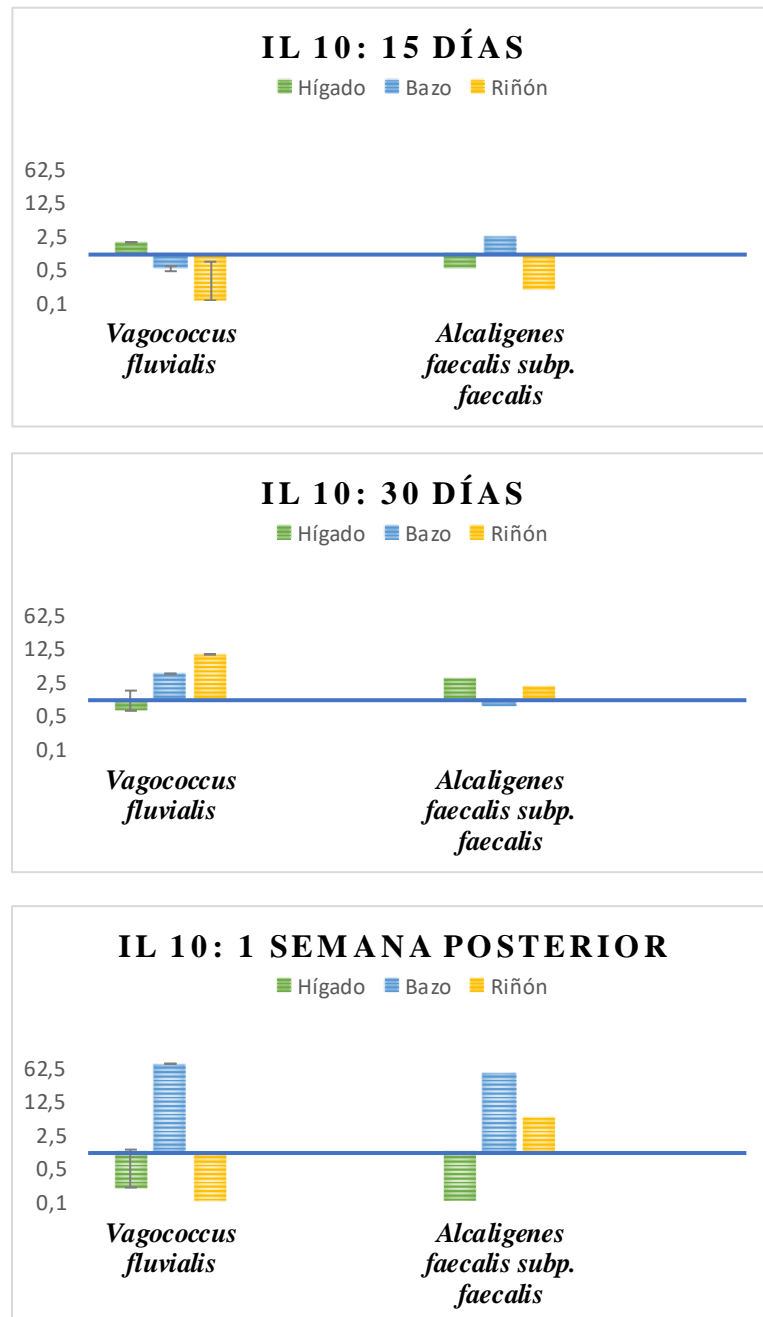
Finalmente, tras una semana de finalizar con la administración dietética con las cepas potencialmente probióticas, la máxima expresión se observa en las muestras de bazo de ambos grupos, alcanzando valores de expresión entre 45 y 72 veces superiores al control. Asimismo, la muestra de riñón del grupo *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1 sobre-expresa el gen de la citoquina IL-10, a diferencia de las muestras de hígado y el riñón del grupo alimentado con la otra cepa (*V. fluvialis* L21).

Tabla XXII.- Valores de expresión de IL-10 en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales con las cepas *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 y *Vagococcus fluvialis* L21.

	MUESTRA	<i>Vagococcus fluvialis</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>
15 días	Hígado	1,80 ± 0,00	0,53 ± 0,21
	Bazo	0,51 ± 0,06	2,46 ± 0,01
	Riñón	0,11 ± 0,6	0,18 ± 0,07
30 días	Hígado	0,60 ± 0,99	3,00 ± 0,31
	Bazo	3,58 ± 0,04	0,73 ± 0,00
	Riñón	9,09* ± 0,01	1,95 ± 0,54
1 semana después	Hígado	0,19 ± 0,00	0,10 ± 0,00
	Bazo	73,52* ± 0,04	45,73* ± 0,24
	Riñón	0,07 ± 0,03	5,39 ± 0,00

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al control.

Figura 6.- Expresión génica de IL-10 en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales.



Las barras representan la desviación típica (s)

- Expresión del gen COX-2:

Los niveles de expresión de la citoquina COX-2 se recogen en la (Tabla XXIII) y en la (Figura 7).

A los 15 días desde el comienzo con la experiencia de alimentación con cepas probióticas, se observa una ligera sobre-expresión en las muestras de bazo de los animales muestreados en el grupo alimentado con la cepa *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1. Sin embargo, el resto de las muestras se sub-expresan en comparación al grupo control.

En el siguiente periodo (día 30), se evidencia sobre-expresión del gen COX-2 en ambos grupos tratados, a excepción de las muestras de hígado y bazo de los peces alimentados con *V. fluvialis* L21 y *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 respectivamente, en los que existe sub-expresión de la citoquina con respecto al grupo control.

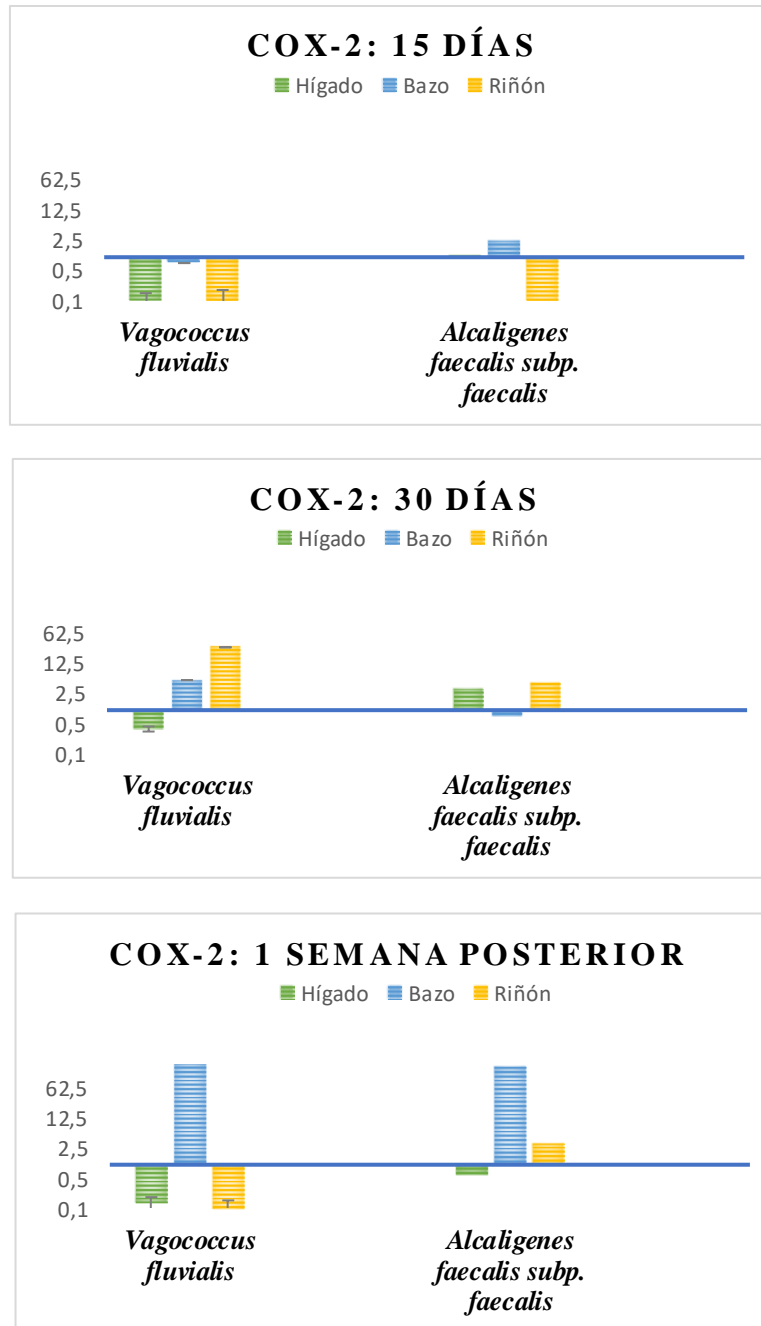
Finalmente, una semana tras terminar de administrar la dieta, la máxima expresión del gen se evidencia en las muestras pertenecientes al bazo de ambos grupos, alcanzando valores muy elevados de sobre-expresión con respecto al grupo control.

Tabla XXIII.-Valores de expresión de COX-2 en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales con las cepas *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 y *Vagococcus fluvialis* L21.

	MUESTRA	<i>Vagococcus fluvialis</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>
15 días	Hígado	0,10 ± 0,05	1,11 ± 0,01
	Bazo	0,73 ± 0,00	2,45 ± 0,34
	Riñón	0,09 ± 0,6	0,07 ± 0,23
30 días	Hígado	0,37 ± 0,11	3,08 ± 0,00
	Bazo	4,92 ± 0,04	0,73 ± 0,29
	Riñón	27,95* ± 0,08	4,32 ± 0,38
1 semana después	Hígado	0,13 ± 0,00	0,59 ± 0,25
	Bazo	228,3*3 ± 0,11	174,25* ± 0,08
	Riñón	0,07 ± 0,04	3,11 ± 1,34

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al control.

Figura 7.- Expresión génica de COX-2 en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales.



Las barras representan la desviación típica (s)

- Expresión del gen Mx:

En la (Tabla XXIV) y (Figura 8) se recoge la expresión del gen Mx, de ella podemos extraer lo siguiente:

A los 15 días, se evidencia sobre-expresión génica respecto al control en todas las muestras de los animales alimentados con las cepas probióticas, a excepción de la muestra analizada de hígado de los animales tratados con la cepa con *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1, correspondiéndose los mayores valores con las muestras de riñón de ambos grupos, con expresiones 8 veces superiores con respecto al grupo control.

El día 30, los mayores valores de expresión génica corresponden a las muestras de hígado de los animales alimentados con *Vagococcus fluvialis* L21. También hay sobre-expresión respecto al grupo control en las muestras de bazo de ambos grupos de animales tratados. En el resto de órganos, podemos observar la sub-expresión de este gen respecto al control

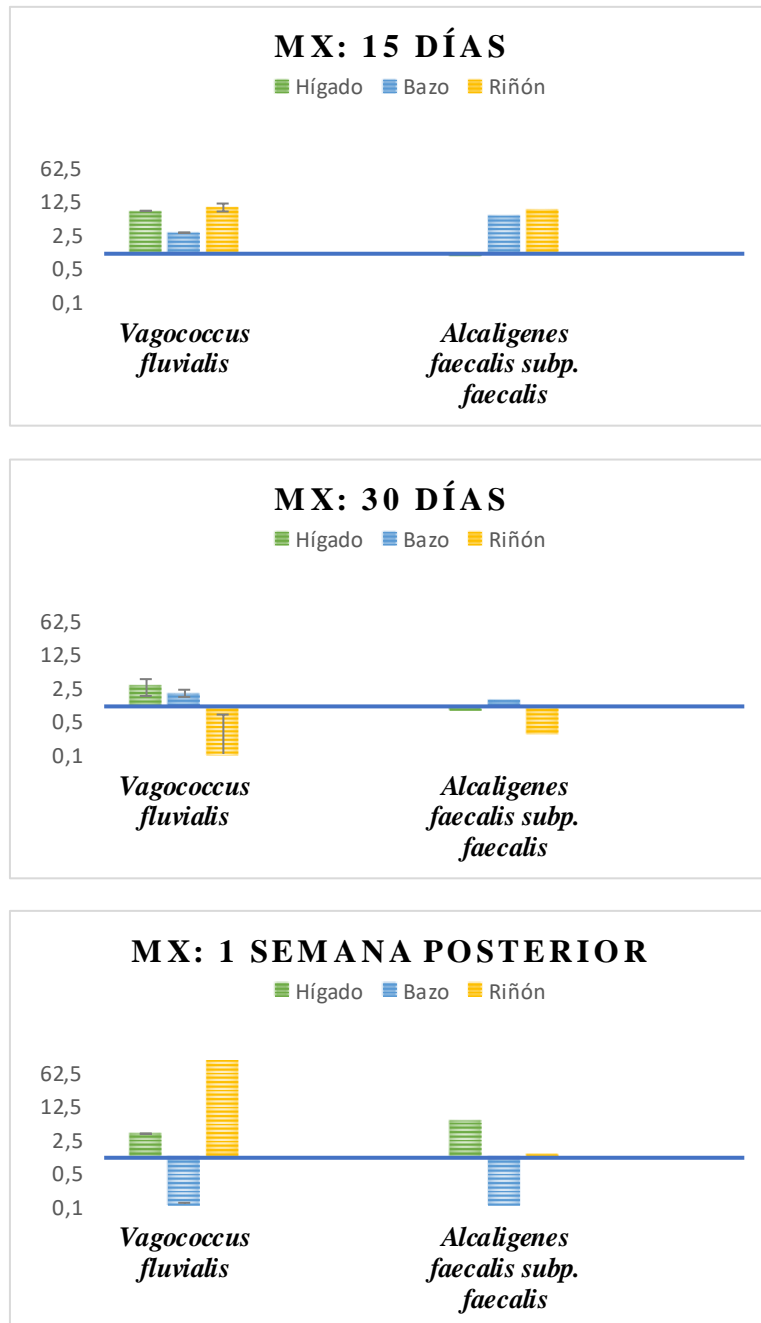
Una semana tras finalizar la administración de los probióticos, se evidencian valores muy elevados de expresión del gen Mx en la muestra analizada de riñón del grupo alimentado con la cepa *Vagococcus fluvialis* L21. También se sobre-expresa en las muestras de hígado de ambos grupos, sin embargo, las muestras de bazo se sub-expresan con respecto al grupo control, justo lo contrario que ocurría al gen analizado anteriormente (COX-2)

Tabla XXIV.-Valores de expresión de Mx en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales con las cepas *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 y *Vagococcus fluvialis* L21.

	MUESTRA	<i>Vagococcus fluvialis</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>
15 días	Hígado	7,86* ± 0,07	0,90 ± 0,46
	Bazo	2,75 ± 0,00	6,11* ± 0,25
	Riñón	9,42* ± 1,79	8,20* ± 0,46
30 días	Hígado	2,69 ± 1,03	0,78 ± 0,00
	Bazo	1,91 ± 0,33	1,37 ± 0,00
	Riñón	0,03 ± 0,65	0,26 ± 0,06
1 semana después	Hígado	3,18 ± 0,00	5,86 ± 0,00
	Bazo	0,02 ± 0,10	0,02 ± 0,14
	Riñón	174,85* ± 0,06	1,22 ± 0,00

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al control.

Figura 8.- Expresión génica de Mx en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales.



Las barras representan la desviación típica (s)

- Expresión del gen Casp-3:

En la (Tabla XXV) y (Figura 9) se representa la expresión del gen Caspasa-3, una citoquina que juega un papel clave en la apoptosis.

El día 15 tras el comienzo con la administración de la dieta probiótica, se puede contemplar que hay una ligera sobre-expresión en las muestras de bazo pertenecientes al grupo de animales que fueron alimentados con la cepa probiótica *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1., con un valor 1,5 veces superior al grupo control. En el resto de las muestras de ambos grupos existe sub-expresión con respecto del gen Casp-3 con respecto al grupo control.

El día 30, se evidencia una mayor expresión de esta citoquina. En el caso de los animales alimentado con la dieta con *Vagococcus fluvialis* L21 se aprecia sobre-expresión en los órganos hígado y riñón, con unos valores de expresión 5 veces superiores al grupo control. En el grupo tratado con la cepa *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1, la sobre-expresión respecto al control se limita al hígado, con un valor estadísticamente significativo, 12 veces superior al grupo control.

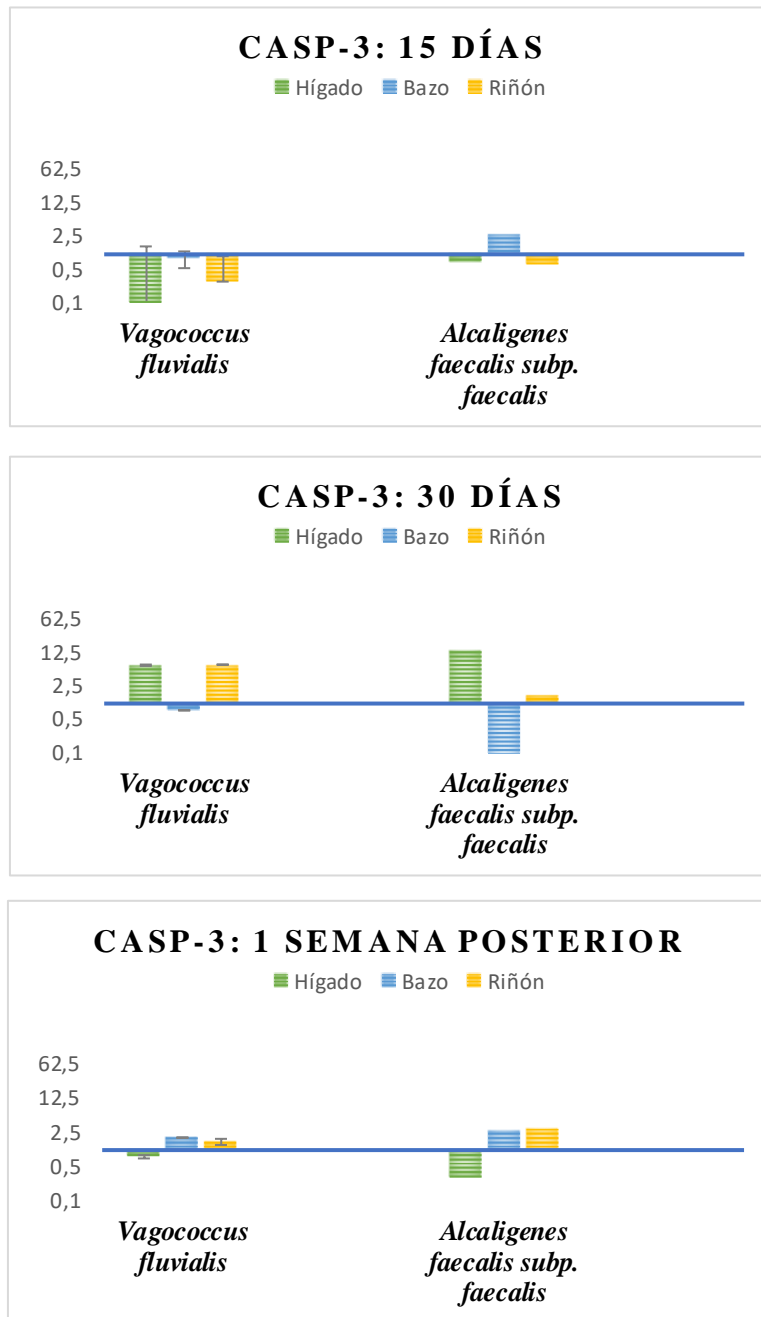
Una semana tras finalizar con la administración de la dieta experimental, se sobre-expresan las muestras pertenecientes al bazo y riñón de ambos grupos de animales tratados, siendo superior en el grupo tratado con la cepa *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1.

Tabla XXV.- Valores de expresión de Casp-3 en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales con las cepas *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1 y *Vagococcus fluvialis* L21.

	MUESTRA	<i>Vagococcus fluvialis</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> subp. <i>faecalis</i>
15 días	Hígado	0,09 ± 1,37	0,68 ± 0,12
	Bazo	0,83 ± 0,32	2,49 ± 0,15
	Riñón	0,27 ± 0,64	0,60 ± 0,16
30 días	Hígado	6,32* ± 0,22	13,22* ± 0,01
	Bazo	0,72 ± 0,00	0,04 ± 0,00
	Riñón	6,50* ± 0,06	1,47 ± 0,14
1 semana después	Hígado	0,73 ± 0,06	0,26 ± 0,66
	Bazo	1,80 ± 0,02	2,59 ± 0,04
	Riñón	1,48 ± 0,21	2,79 ± 0,00

* Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al control.

Figura 9.- Expresión génica de Casp-3 en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales.



Las barras representan la desviación típica (s)

- Expresión del gen TNF- α :

La cinética de expresión del gen TNF- α durante la experiencia de alimentación con las cepas probióticas se recoge en la (Tabla XXVI) y se representa en la (Figura 10).

El día 15 desde el comienzo del experimento, existe sobre-expresión génica de TNF- α en las muestras de bazo de ambos grupos, siendo superior el valor en el grupo alimentado con el probiótico *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis-1*.

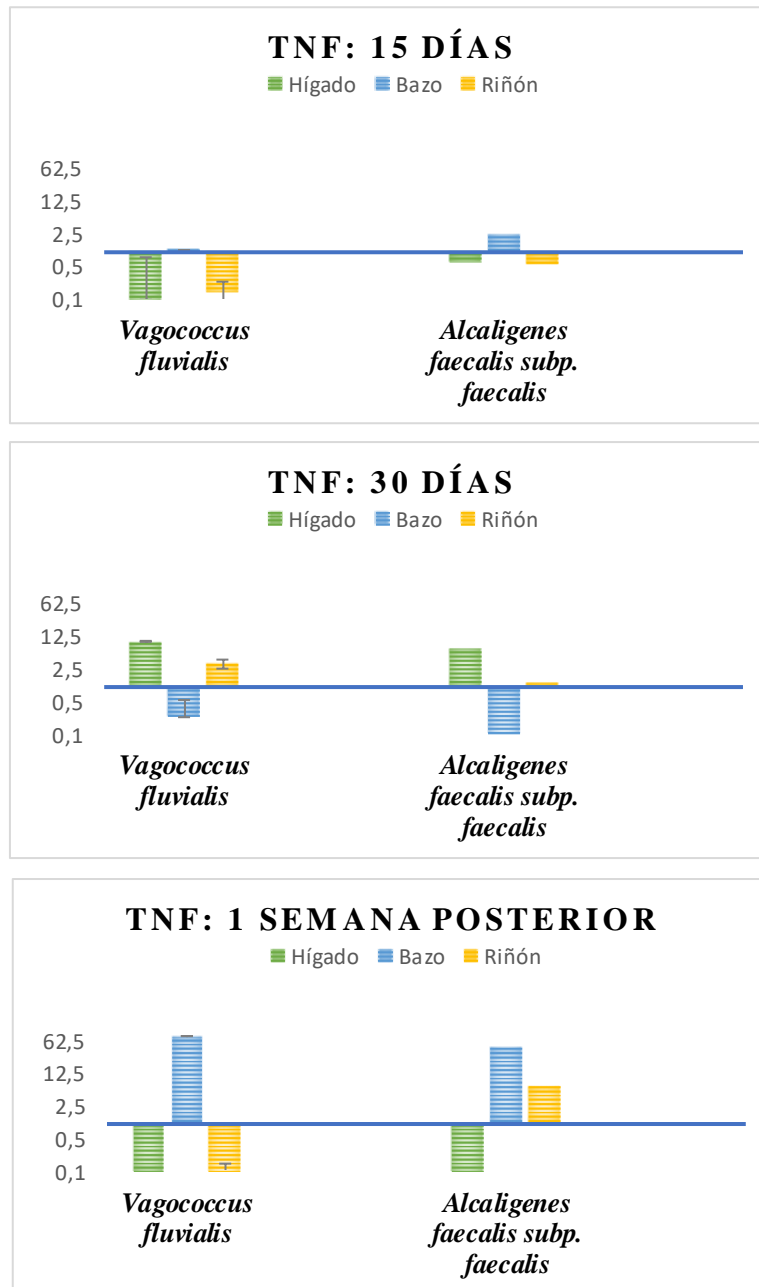
El día 30, la expresión génica es ligeramente más notable en las muestras de hígado y riñón de ambos grupos, llegándose a expresar entre 4 y 7 veces más en las muestras de hígado de los animales tratados que en los animales del grupo control (alimentados sin probióticos). Por el contrario, en el bazo de ambos grupos encontramos sub-expresión de este gen.

Una semana tras finalizar con la dieta, la expresión del gen TNF- α se invierte con respecto al periodo anterior, sobre-expresándose de forma considerable en las muestras de bazo de los animales alimentados con probióticos, llegando a expresarse aproximadamente entre 45 (*Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis-1*) y 74 (*Vagococcus fluvialis* L21) veces más que el grupo control. En las muestras de hígado y riñón hay sub-expresión de este gen en el grupo tratado con *Vagococcus fluvialis* L21, mientras que en el grupo tratado con *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis-1* hay sub-expresión únicamente en hígado.

Tabla XXVI.- Valores de expresión de TNF- α en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales con las cepas *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 y *Vagococcus fluvialis* L21.

	MUESTRA	<i>Vagococcus fluvialis</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>
15 días	Hígado	0,10 \pm 0,69	0,63 \pm 0,07
	Bazo	1,09 \pm 0,0	2,48 \pm 0,33
	Riñón	0,14 \pm 0,09	0,56 \pm 0,42
30 días	Hígado	9,42* \pm 0,23	6,94* \pm 0,0
	Bazo	0,23 \pm 0,30	0,04 \pm 0,30
	Riñón	3,16 \pm 0,69	1,26 \pm 0,23
1 semana después	Hígado	0,09 \pm 0,00	0,08 \pm 0,24
	Bazo	74,80* \pm 0,03	41,07* \pm 0,52
	Riñón	0,05 \pm 0,09	6,70* \pm 0,0

Figura 10.- Expresión génica de TNF- α en lubina en el ensayo de administración de las dietas experimentales.



Las barras representan la desviación típica (s)

V.5.- EXPERIENCIA DE PERITONITIS FECALOIDE EN RATAS

V.5.1.- INOCUIDAD

El grupo de ratas pretratadas durante una semana con la cepa probiótica seleccionada (*Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1) y evaluados a los 7, 15 y 30 días después de la primera dosis del probiótico, grupos HA7, HA15 y HA30, no mostraron cambios significativos en la temperatura corporal o el peso, en comparación con sus respectivos grupos de control sanos sin pretratamiento.

La supervivencia de los animales, tras la administración de la cepa *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1, fue del 100% en todos los grupos. Por otro lado, no se encontraron cambios significativos en la mayoría de los parámetros hematológicos y bioquímicos analizados. Todos los grupos control (HC7, HC15 y HC30) mostraron valores similares a los encontrados en las ratas pretratadas con el probiótico, a excepción del porcentaje de eosinófilos en sangre y los niveles séricos de CREA y ALTL.

En estos parámetros se observó un incremento a los 7 días de la administración de *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1, seguido de una progresiva normalización (Tabla XXVII). En cuanto al estudio histológico, tampoco se encontraron signos de lesión en ninguno de los órganos de los animales pertenecientes a los diferentes grupos.

Tabla XXVII.- Parámetros hematológicos en diferentes momentos tras la administración de *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1.

	HC	HA7	HA15	HA30
Glóbulos rojos (RBC) ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	10.2 (9.8-10.6)	10.2 (10.2-10.3)	10.1 (10-10.1)	9.3 (8.81-10.1)
Hemoglobina (HGB) (g/dl)	17.2 (16.8-17.7)	16.7 (16-17)	16.5 (16.1-17.3)	15.7 (15.3-17.5)
Hematocrito (HCT) (%)	53.4 (51.97-54.42)	52.1 (48.1-52.1)	52.9 (52.7-52.9)	48.9 (47-54.5)
Plaquetas (PLT) ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1011 (894-1030.25)	925 (904-944)	1039 (991-1076)	1011 (1005-1063)
Leucocitos (WBC) ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	7.91 (7.17-9.17)	8.83 (7.65-9.29)	8.1 (7.57-8.66)	7.21 (6.98 – 7.54)
Neutrófilos segmentados (S) (%)	18 (14.7-21.18)	17.1 (16.2-18.5)	15.7 (11.8-16.5)	18.8 (17.6 – 19.1)
Monocitos (Me) (%)	0.83 (0.62-1.46)	0.72 (0.56-2.09)	0.86 (0.55-1.02)	0.52 (0.48-0.75)
Eosinófilos (E) (%)	0.32 (0-0.91)	1.5 (1.45-1.82)	0 (0-0.21)	0 (0-0)**
Basófilos (B) (%)	1.41 (0.79-2.36)	0.85 (0.5-1.52)	2.3 (1.91-2.87)	0.94 (0.76-1.09)
Linfocitos (Le) (%)	42 (37.68-44.47)	43.5 (43-47.1)	44.1 (41.4-45.3)	49.5 (45.9-52.4)

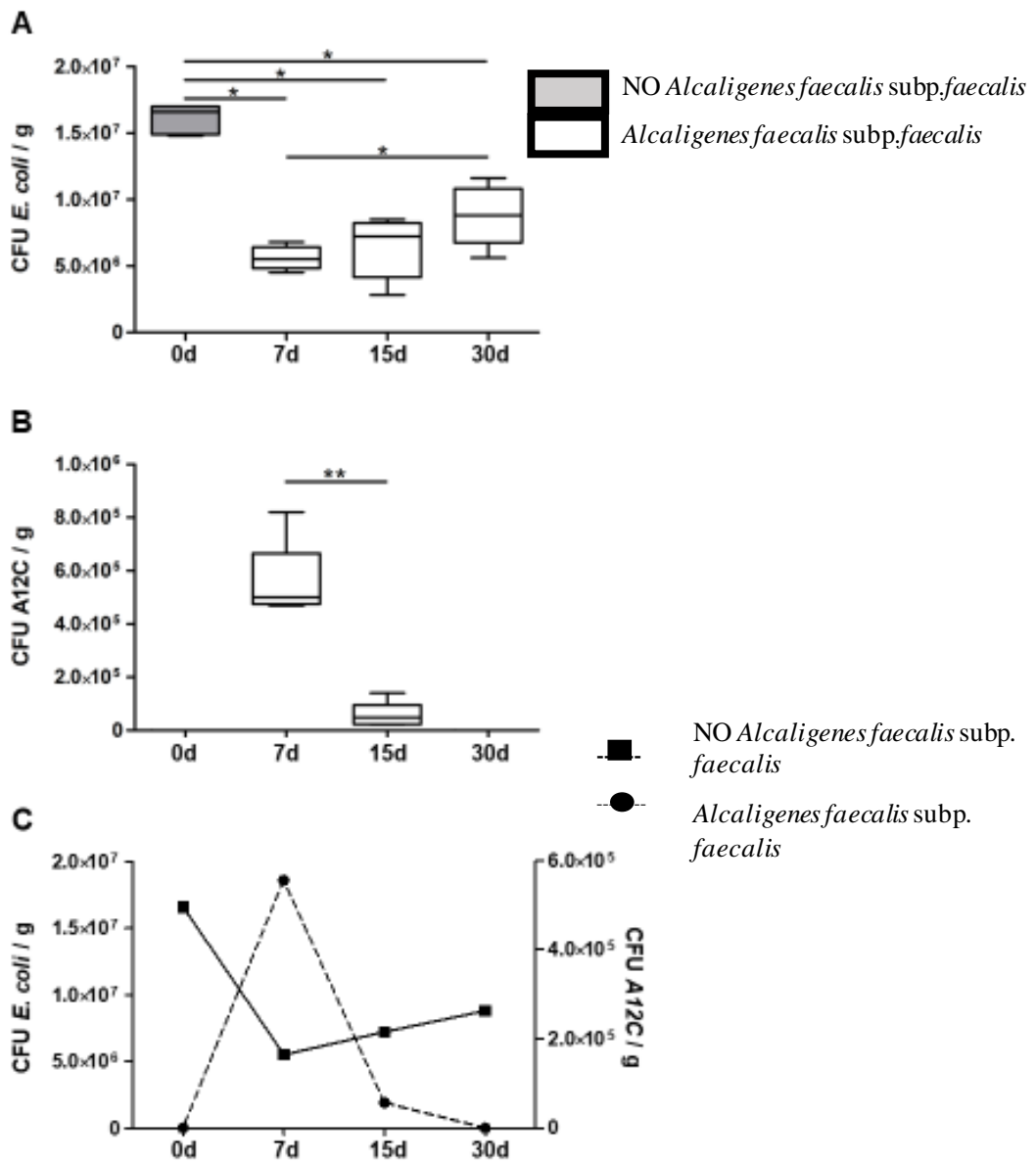
Los resultados se expresan como la mediana (rango intercuartílico) de ratas sin administración de la cepa probiótica *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 (HC, n = 15), 7 días (HA7, n = 5), 15 días (HA15, n = 5) y 30 días (HA30, n = 5) post administración del probiótico durante una semana.

** $p < 0.01$ versus HA7 por la prueba U de Mann-Whitney.

V.5.2.- CONDICIONES DE COLONIZACIÓN INTESTINAL

La concentración de *E. coli* y *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 en heces mostró una disminución significativa de *E. coli*, junto con un aumento de *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1, a los 7 días después de la administración de esta cepa, como se muestra en la Figura 11. Posteriormente, la concentración de *E. coli* tuvo tendencia a recuperar los valores iniciales a los 30 días, mientras que la cepa probiótica *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 desapareció de la microbiota intestinal al mismo tiempo (30 días).

Figura 11.- Concentración en heces de *E. coli* (A) y *Alcaligenes faecalis subsp. faecalis*-1 (B) en diferentes momentos en grupos tratados con el probiótico evaluados a los: 0 días (justo antes de la administración del probiótico) y 7 días, 15 días y 30 días después de la primera dosis de probiótico. La evolución simultánea de la concentración de ambas cepas se muestra en (C). Los diagramas de caja y bigotes representan la observación más pequeña, el cuartil inferior, la mediana, el cuartil superior y la observación más grande.



* $p < 0,003$, ** $p < 0,0005$ según el test de Kruskal-Wallis.

V.5.3.- ACTIVIDAD PROBIÓTICA CONTRA LA INFECCIÓN

EVOLUCIÓN CLÍNICA

Todos los animales de ambos grupos, grupo tratado con la cepa probiótica e inoculado con *E. coli* (IA), así como grupo control no tratado con la cepa probiótica e inoculado con *E. coli* (IC) tuvieron una supervivencia del 100%. En ningún caso fue necesario recurrir a la eutanasia. Sin embargo, hubo mayor presencia de animales con signos de malestar en el grupo IC con respecto al IA. Así, se observó pelaje erizado en todos los animales IC y secreción ocular en 3 de ellos, mientras que solo se observó pelaje erizado en 3 animales del grupo IA. En ambos casos, los signos desaparecieron con tratamiento analgésico, durante los tres primeros días post-inoculación.

En el Grupo IC, se observó una disminución del peso corporal entre los días 15 (eutanasia) y 7 (inoculación de *E. coli*). Sin embargo, en el grupo IA, se observó un aumento en el mismo período de tiempo (Figura 12).

Por otro lado, los únicos cambios significativos evidenciados en el hemograma y en la bioquímica sérica fueron un aumento de la alanina aminotransferasa, el nitrógeno ureico en sangre y los eosinófilos en el grupo CI con respecto a IA. (Figura 13, Tabla XXVIII).

Figura 12.- Pérdida de peso corporal, expresada como diferencia en gramos entre el peso justo en el momento de la inoculación de *E. coli* (7 días) y en el momento de la eutanasia (15 días) (A), o como porcentaje de gramos perdidos durante el mismo período de tiempo (B). Los diagramas de caja y bigotes representan la observación más pequeña, el cuartil inferior, la mediana, el cuartil superior y la observación más grande.

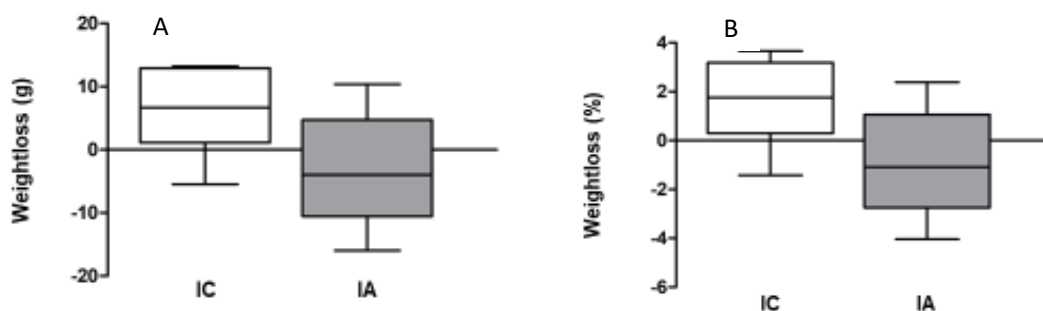
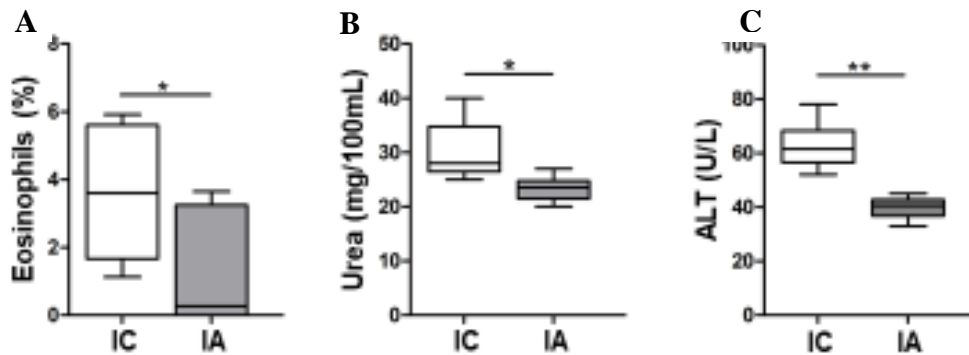


Figura 13.- Porcentaje de eosinófilos, niveles séricos de urea y ALT entre el grupo de control infectado y el grupo infectado tratado con *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1.



** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ según la prueba U de Mann-Whitney.

Tabla XXVIII.-Parámetros bioquímicos en diferentes momentos tras la administración de *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1.

	HC	HA7	HA15	HA30
AST (IU/l)	128.5 (120.25-141.25)	86 (82-88)*	92(87-93)#	150 (146-156)**
ALT (IU/l)	42 (38.25-44.75)	38 (34-40)	35 (34-36)	33 (33-40)
BUN (mg/dl)	29 (28-31)	29 (27-31)	30 (29-30)	28 (28-29)
CREA (mg/dl)	0.3 (0.29-0.33)	0.35 (0.33-0.35)	0.31 (0.31-0.32)	0.27 (0.27-0.28)#
TBIL(mg/dl)	0.07 (0.07-0.08)	0.08 (0.07-0.08)	0.08 (0.08-0.09)	0.05 (0.05-0.07)

Los resultados se expresan como la mediana (rango intercuartílico) de ratas sin administración de *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 (HC, n = 15) o 7 días (HA7, n = 5), 15 días (HA15, n = 5) y 30 días (HA30, n = 5) después de la administración de la misma cepa durante una semana.

* $p < 0,05$ frente a HC, ** $p < 0,01$ frente a HA7, # $p < 0,02$ frente a HA30 según la prueba U de Mann-Whitney.

CONTROL MICROBIOLÓGICO

Todos los animales de los grupos control (IC) y grupo experimental con probiótico (IA), presentaron hemocultivos, lavado broncoalveolar y orina negativos a los 7 días post-infección por *E. coli*, excepto un animal del grupo IC en el que se aislaron *Aerococcus viridans* y *Staphylococcus xylosus* en el hemocultivo.

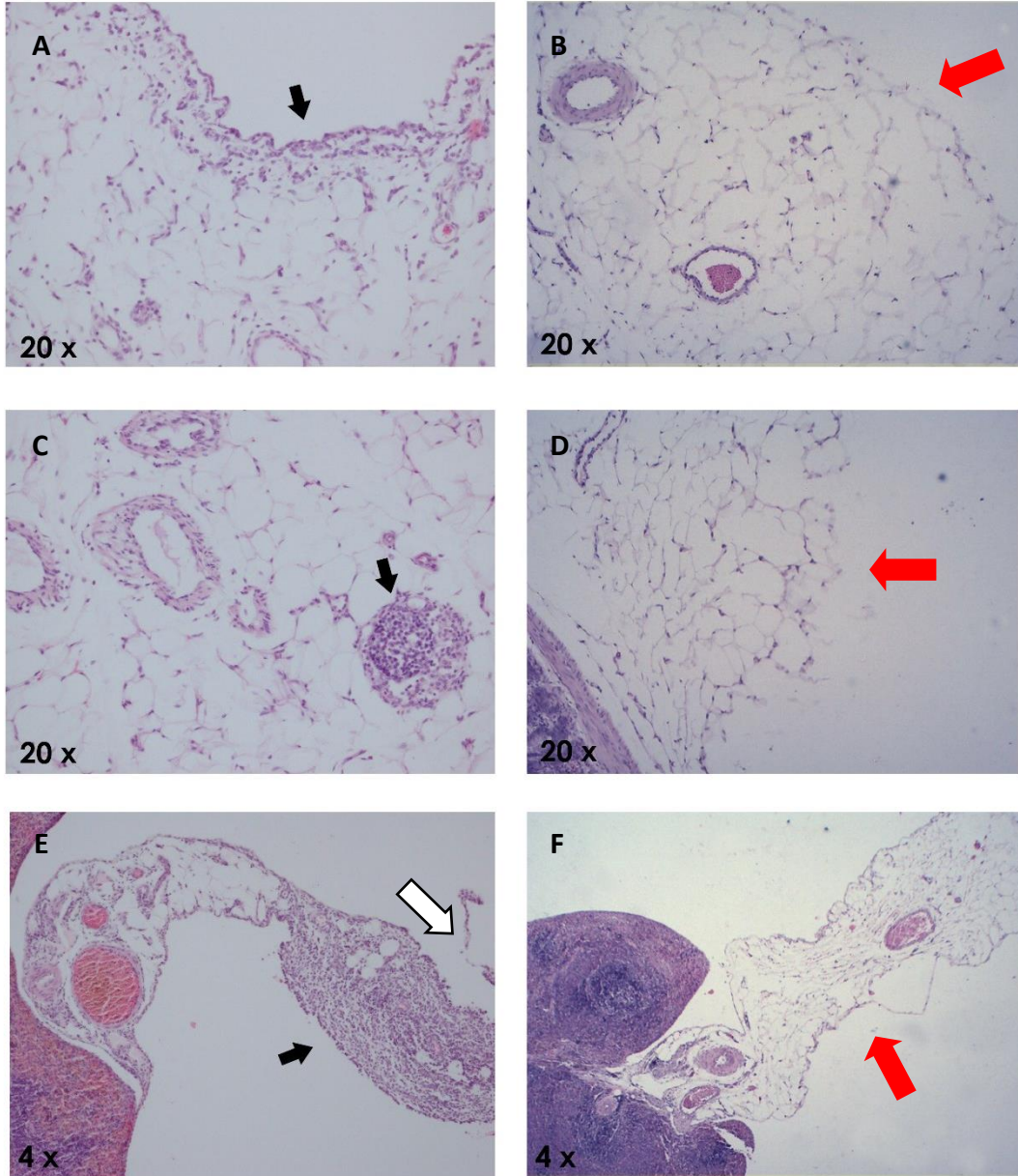
EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

A excepción del peritoneo, no se observaron cambios histológicos significativos en ninguno de los órganos analizados, en ambos grupos.

En el grupo IC se clasificaron cuatro animales con un valor de grado 1 y dos ratas con un valor de grado 2, según la puntuación de peritonitis utilizada (Tabla IX). En estos animales se observó dilatación de los capilares subserosos, opacidad de la superficie peritoneal e hinchazón de las células mesoteliales, así como descamación focal de las células mesoteliales, película delgada de fibrina exudativa e infiltrado polimorfonuclear mixto de leve a moderado. Estas lesiones fueron más evidentes en el peritoneo cerca de los ganglios linfáticos mesentéricos, el hilio esplénico y el yeyuno. Sin embargo, no se encontraron lesiones compatibles con peritonitis en ningún animal del grupo IA, excepto en uno de ellos, que se clasificó con un valor de grado 1.

Las lesiones histológicas representativas se muestran en la Figura 14. Podemos observar, embotamiento de la superficie peritoneal e hinchazón de las células mesoteliales (flecha negra) en el peritoneo yeyunal (A) y el hilio peritoneal esplénico (E), así como descamación focal de las células mesoteliales (flecha blanca) en el peritoneo del hilio esplénico (E). También observamos infiltrado polimorfonuclear mixto (flecha negra) en tejido graso y peritoneo cerca de linfonodos mesentéricos (C), en una rata del grupo IC. No hay signos de inflamación o alteración tisular (flecha roja) en la superficie peritoneal del peritoneo yeyunal (B), ni ganglios linfáticos mesentéricos (D) ni hilio esplénico (F) en una rata del grupo IA.

Figura 14.- Imágenes histológicas representativas de secciones teñidas con hematoxilina- eosina del peritoneo yeyunal (A, B), los ganglios linfáticos mesentéricos (C, D) y el hilio esplénico (E, F).



A decorative graphic at the top of the page featuring a blue, textured splash or wave pattern that tapers off towards the right. The word "DISCUSIÓN" is centered within this graphic.

DISCUSIÓN

VI.-DISCUSIÓN

La industria de la acuicultura ha experimentado un crecimiento exponencial en las últimas décadas, tratando de satisfacer la demanda de pescado de una población en aumento. Sin embargo, la intensificación en la producción trae consigo repercusiones negativas, siendo la degradación medioambiental una de las más preocupantes, la cual es debida a la producción de residuos orgánicos que consumen el oxígeno disuelto en los tanques de cultivo, lo cual se traduce en la presencia de metabolitos tóxicos que son responsables de altas tasas de mortalidad en el sector (Martínez Cruz *et al.*, 2012). Otra consecuencia ha sido la aparición de enfermedades infecto-contagiosas, que suponen un gran obstáculo para la sostenibilidad acuícola y que han ido en incremento desde el comienzo de esta práctica (Mardones *et al.*, 2018).

Para solventar la problemática referida a los brotes de enfermedades infecciosas, se ha recurrido durante mucho tiempo al empleo de antibióticos y quimioterápicos como medidas preventivas y de control (Serrano, 2005). No obstante, un uso excesivo e indebido de los mismos, ocasiona efectos adversos en los peces y en su entorno (Suzuki *et al.*, 2017), no sólo provocando contaminación medioambiental, sino también la aparición de cepas resistentes a los antibióticos (Cabello, 2006), que pueden afectar y repercutir negativamente en la salud humana (Cheng *et al.*, 2014). Por estos motivos, se establecieron una serie de limitaciones y prohibiciones en su uso, y comenzó la búsqueda de nuevas alternativas o herramientas biológicas, efectivas y respetuosas con el medio ambiente para controlar las enfermedades infecciosas (Defoirdt *et al.*, 2011), como el desarrollo de vacunas, el uso de inmunoestimulantes o mediante la administración de microorganismos vivos que presentan efecto antagónico frente a diferentes patógenos de acuicultura, los probióticos (Hjelm *et al.*, 2004; Makridis *et al.*, 2005), que hoy en día constituyen una de las estrategias de control y prevención más aceptadas en el sector de la acuicultura, aunque su utilización se remonta muchos años atrás en animales terrestres y en humanos (Irianto y Austin 2002).

La evaluación y caracterización de las cepas probióticas se realiza mediante el estudio de su mecanismo de acción y del efecto que produce en el hospedador. Dicho mecanismo de acción puede ser muy diverso, por ejemplo, mediante la producción de efecto inhibitorio sobre el crecimiento de agentes patógenos, a través de la competición

por los nutrientes disponibles o por los lugares de fijación a nivel intestinal, modificando la actividad enzimática y/o aportando beneficios nutricionales. Estos microorganismos también se han visto implicados en la mejora de la calidad del agua y la estimulación del sistema inmunológico.

Las bacterias Gram-positivas son el grupo predominante de probióticos en acuicultura, principalmente las bacterias ácido-lácticas del género *Bacillus*. No obstante, algunos géneros de bacterias Gram-negativas han sido también utilizados en acuicultura, como las *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas* y algunos géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (Nayak, 2010a).

Para este trabajo, se han empleado tres especies de peces de la acuicultura marina cultivadas en el Archipiélago Canario, la lubina (*D. labrax*), corvina (*A. regius*) y lenguado común (*S. solea*), con la finalidad de aislar y seleccionar el mayor número posible de cepas bacterianas con actividad potencialmente probiótica, y que se pudiera extender su uso a todas ellas e incluso a otras especies. La selección de las cepas se llevó a cabo analizando una serie de propiedades que deben cumplir para poder ser consideradas cepas potencialmente probióticas.

La preselección inicial se llevó a cabo analizando la capacidad de producir efecto inhibitorio en el crecimiento de uno o varios patógenos de acuicultura marina y continental. Tras la toma de muestras de agallas y contenido intestinal en los peces seleccionados, se aislaron 156 cepas, de las cuales 48 presentaron la capacidad de inhibir el crecimiento de una o varias de las cepas patógenas seleccionadas en dicho ensayo, pero tras el almacenamiento, dejaron de manifestar dicho efecto inhibitorio, hecho ya descrito anteriormente por Olsson *et al.* (1992), quienes afirmaron que la producción de sustancias extracelulares con efectos inhibitorios solo se presentaba si la bacteria tenía a su disposición todos los nutrientes esenciales para su crecimiento y reproducción. En consecuencia, de las 48 cepas que mostraron inicialmente efecto inhibitorio, únicamente 12 cepas lo mantuvieron en el tiempo, y sobre ellas se ha llevado a cabo el resto de pruebas laboratoriales complementarias. En este ensayo los resultados fueron muy variados, y así, mientras algunas cepas mostraban efecto inhibitorio frente a una única cepa patógena, otras eran capaces de inhibir varias de las cepas patógenas analizadas, destacando sobremanera la cepa A12C, posteriormente identificada como *Alcaligenes faecalis* subsp.

faecalis-1, que produjo inhibición en el crecimiento bacteriano de todas las cepas patógenas probadas.

Continuando con la caracterización *in vitro* de las 12 cepas preseleccionadas, se determinó la producción de sustancias antibacterianas, ensayo que nos permite evaluar si el efecto inhibitorio observado en el ensayo anterior es debido a la producción de sustancias extracelulares con efecto antibacteriano producidas por las cepas potencialmente probióticas durante su crecimiento. En este trabajo, exclusivamente las cepas *Shewanella putrefaciens* y *Lactobacillus kefir* revelaron un halo inhibitorio al enfrentarse con las cepas patógenas mediante el método de difusión en pocillo. En el caso de la cepa *Shewanella putrefaciens* las zonas de inhibición se produjeron alrededor de los pocillos con sobrenadante de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHIB) neutralizados con hidróxido de sodio (NaOH) y no neutralizados frente a *V. anguillarum* 975-1, mientras que en la cepa *Lactobacillus kefir* el resultado positivo se evidenció exclusivamente alrededor del pocillo con sobrenadante no neutralizado. La presencia de esa zona de inhibición alrededor del pocillo no neutralizado quiere decir que las sustancias antibacterianas podrían ser producidas por la presencia de ácidos, mientras que si sucede en pocillos con sobrenadantes neutralizados, la naturaleza de las sustancias podría ser debida a otros compuestos diferentes a los ácidos (Sorrosa, 2012). En estudios previos se ha indicado que el efecto inhibitorio puede ser debido a la producción de compuestos volátiles, ácidos orgánicos o bacteriocinas (Balcázar *et al.*, 2007).

Uno de los requisitos fundamentales para seleccionar a una cepa como candidata probiótica es que pueda ser capaz de sobrevivir a pH ácidos y a la acción de la bilis, a fin de que resistan el tránsito gastrointestinal y puedan llegar a colonizar el intestino, al ser administradas a los peces por vía oral (Robertson *et al.*, 2000; Irianto y Austin, 2002; Nikoskelainen *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en esta prueba, señalan que la viabilidad de las 12 cepas preseleccionadas se ve afectada por la acción de la bilis de lubina (*D. labrax*), pero se debe tener en cuenta que la concentración de bilis utilizada en este ensayo (10%) es muy alta en comparación con la concentración fisiológica en humanos, que es aproximadamente del 3%, ya que aún no se conoce con exactitud la concentración real de bilis en los peces que puede existir a nivel intestinal, de modo que para llevar a cabo este ensayo, se realiza una sobreestimación de la concentración de sales biliares (Nikoskelainen *et al.*, 2001a).

La bilis extraída de lubina (*D. labrax*) redujo de manera significativa ($p < 0,05$) la supervivencia de las cepas preseleccionadas como potenciales cepas probióticas tras 90 min de contacto con la misma, comparándolas con el control (100% de supervivencia sin bilis), a excepción de las cepas *Proteus penneri*-1, *Pseudomonas veronii* y *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1, que mostraron tasas de supervivencia de 99,2%, 97,8 y 95,7%, respectivamente. La cepa que mostró una mayor susceptibilidad a la acción de la bilis fue *Pseudomonas fluorescens*, con solo un 1,8% de supervivencia, mientras que el resto de las cepas se muestran valores de supervivencia en el rango de un 30-80%.

Por otro lado, valores bajos de pH afectaron a la viabilidad de todas las cepas analizadas. Sin embargo, se debe considerar que la administración de las cepas probióticas se realiza generalmente por vía oral junto con el alimento, por lo que la acción de las secreciones estomacales no son directas, quedando la bacteria cubierta dentro del bolo alimenticio (Nikoskelainen *et al.*, 2001b; Sorroza *et al.*, 2012). Además, en los procesos digestivos intervienen otros elementos como el agua, los iones inorgánicos, así como el número de tomas diarias de alimento (Nikolopoulou *et al.*, 2011). También en esta prueba resultaron ser las cepas *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1 (91,64%) y *Proteus penneri*-1 (89,58%) las que mostraron mayores valores de supervivencia a pH 6 y, a medida que las cepas se ponen en contacto con un medio más ácido, la reducción de la viabilidad bacteriana era más notoria. A pH 5, la cepa que presentó una mayor viabilidad fue *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1 con un 74,31%, mientras que *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-2 es la más afectada, presentando una supervivencia del 41,56%. A pH 4 y 3 se reduce drásticamente la viabilidad de las cepas seleccionadas, siendo la cepa *Proteus penneri* -1 la más resistente en medios ácidos, al contrario de lo que le ocurre con las cepas *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-2 (4,91%) y *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-3 (2,92%), que son las cepas que mayor susceptibilidad presentan frente a valores bajos de pH.

También debemos tener en cuenta que, si las cepas probióticas fuesen a ser utilizadas en larvas, no debería haber problema con el pH ácido, debido a que, en estadios tempranos del desarrollo de los peces, el pH estomacal es moderadamente alcalino (Fjellheim *et al.*, 2010), el tracto digestivo larval no está totalmente desarrollado todavía, y la bilis no es secretada hasta periodos posteriores del desarrollo (Vine *et al.*, 2006).

En este punto, ya comienza a llamar la atención la elevada capacidad de supervivencia demostrada por la cepa *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1, aislada de la agalla de un ejemplar de corvina (*A. regius*), en las pruebas anteriores, con una supervivencia del 74,3% a pH 5 y del 95,7% en contacto con la bilis de lubina (*D. labrax*). Estos datos, junto a su enorme versatilidad a la hora de inhibir *in vitro* el crecimiento de todas las cepas patógenas analizadas en este estudio, tanto de la acuicultura continental como marina, la hacen candidata idónea para continuar su caracterización *in vitro* y posteriormente *in vivo*, acercándola más a su propuesta definitiva como cepa probiótica en acuicultura.

Otra de la característica que debe tener una cepa potencialmente probiótica, es la capacidad de adhesión al mucus o mucosa intestinal (Nikoskelainen *et al.*, 2001b). Esta es una cualidad indispensable, ya que constituye el primer paso para que la cepa se establezca en el intestino y lo colonice (Collado *et al.*, 2007), pasando a formar parte de la primera barrera defensiva de los peces. De lo contrario, la cepa probiótica no podría sobrevivir y competir con los agentes patógenos, por lo que sus efectos beneficiosos en el hospedador serían pasajeros (Verschuere *et al.*, 2000b; Vine *et al.*, 2006). En nuestro caso, también se evaluó la capacidad de adhesión en mucus cutáneo e intestinal de lubina (*D. labrax*).

Los resultados obtenidos en este ensayo de adhesión en mucus fueron muy dispares entre sí, y aunque la mayoría de las cepas analizadas mostraron una capacidad de adherencia en los diferentes mucus por debajo del 10%, la cepa *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-3 destacó entre las demás, mostrando una adhesión del 16,8% en el mucus intestinal y del 26,08% en el mucus de piel de lubina (*D. labrax*).

Una vez la cepa probiótica se adhiere al epitelio intestinal, el siguiente paso sería que creciera en el mucus para se establezca en el intestino (Collado *et al.*, 2007). Todas las cepas fueron capaces de crecer en el mucus intestinal de lubina, y también en el mucus cutáneo tras 24 h de incubación, incrementando en al menos un logaritmo su concentración, lo que nos indica que nuestras cepas potencialmente probióticas serán capaces de establecerse en el intestino y permanecer allí.

Una de las características que sirve como indicador de la capacidad de adhesión en los tejidos, concretamente a las células epiteliales del intestino (Pan *et al.*, 2006) es la

hidrofobicidad, aunque esta propiedad también ha sido relacionada con factores de virulencia de algunos patógenos (Toranzo y Barja, 1993). Según Mattos-Guaraldi *et al.* (1999), las cepas son consideradas muy hidrofóbicas cuando su porcentaje de hidrofobicidad supera el 50%, moderadamente hidrofóbicas cuando su valor de hidrofobicidad se encuentre dentro del rango comprendido entre el 20 y 50%, e hidrofílicas, cuando el valor resultante es inferior a 20%. Aunque Ocaña *et al.* (1999) estableció una clasificación diferente, agrupando a las cepas en función de si la hidrofobicidad era baja, media o alta.

Teniendo en cuenta ambas formas de catalogar a las bacterias en función de su hidrofobicidad, nuestros resultados (Tabla XV) indican que las cepas *Lactobacillus kefir* e I3L, presentan una hidrofobicidad baja, mientras que las cepas *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1, *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-2 y *Pseudomonas* presentan una hidrofobicidad media o moderada. Finalmente, las cepas *Shewanella putrefaciens* y *Pseudomonas viridiflava* presenta una hidrofobicidad muy elevada. Cepas como *Proteus penneri* -2, *Shewanella putrefaciens*, *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-3, *Pseudomonas veronii* y *Proteus penneri*-3 son consideradas hidrofílicas al mostrar valores negativos en el ensayo. Comparando nuestros resultados con estudios anteriores donde analizaban otras cepas con potencial probiótico, aisladas de organismos acuáticos, coincidimos en que la mayoría de las cepas presentan valores de hidrofobicidad inferiores al 50% (Pérez-Sánchez *et al.*, 2011; Montel Mendoza *et al.*, 2012; Garcés. 2018).

También hemos estudiado la competición por nutrientes de nuestras 12 cepas potencialmente probióticas mediante el método de crecimiento en co-cultivo, en la que se produjeron disminuciones en el crecimiento de los patógenos probados hasta valores cercanos al 80%, siendo la cepa patógena *V. anguillarum* 4347 la más afectada.

A pesar de la batería de pruebas ya mencionadas anteriormente, para que las cepas bacterianas que hemos aislado y caracterizado *in vitro* puedan ser consideradas como verdaderas cepas probióticas para su posible uso en acuicultura, deben someterse también a una serie de ensayos *in vivo*. En primer lugar, demostrando su inocuidad en los peces. Para ello, se seleccionaron las 3 cepas con mejores resultados *in vitro*: *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1, *Shewanella putrefaciens* y *Pseudomonas viridiflava*, siendo la primera (*Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1), la única cepa que resultó completamente inocua en este ensayo con lubinas, por lo que fue la cepa seleccionada para caracterizar

el efecto inmunomodulador en lubina tras adicionarla en un pienso comercial y administrarla en la dieta durante un período de tiempo 30 días. Además de realizar esta experiencia con la cepa *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1, quisimos comparar sus resultados con los obtenidos con una cepa aislada y caracterizada previamente en nuestro laboratorio como cepa probiótica, cepa *Vagococcus fluvialis* L21, con demostrado efecto protector en lubinas (*D. labrax*) frente a la vibriosis causada por *V. anguillarum* (Sorroza *et al.*, 2012) e inmunomodulador *in vitro* (Román *et al.*, 2013).

La inmunomodulación es uno de los mecanismos más estudiados en probióticos (Verschuere *et al.*, 2000; Vine *et al.*, 2006; Merrifield *et al.*, 2010; Sharifuzzaman *et al.*, 2011). La literatura recoge un gran número de cepas probióticas capaces de estimular tanto el sistema inmune innato como el específico en organismos acuáticos (Sharifuzzaman y Austin, 2009; Nayak, 2010a), entre los que se incluye la modulación de la producción de citoquinas. Por ejemplo, se ha observado que cepas como *Lactobacillus rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecium*, modulan la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , el factor de necrosis tumoral- α , IL-8 e γ -interferón (IFN- γ), y de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante- β (TFG- β) (Panigrahi *et al.*, 2007; Picchiatti *et al.*, 2009; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011b).

Son varios los estudios que describen el efecto inmunoestimulante al adicionar las cepas probióticas a la dieta de los animales (Panigrahi *et al.*, 2007; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011b). En nuestro caso, se determinó la expresión de citoquinas que se relacionan de forma directa con la respuesta inmune como la interleuquina 1- β (IL-1 β), la IL-6, IL-10, el factor de necrosis tumoral (TNF- α), inhibidores de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), así como el gen Mx y la Caspasa 3 (Casp-3). Mediante qPCR se analizó la expresión génica a partir de diferentes órganos (hígado bazo y riñón anterior) de juveniles de lubina (*D. labrax*), tras la administración vía oral junto al pienso comercial, de las cepas *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 y *Vagococcus fluvialis*-L21 durante un período de tiempo de 30 días, prolongándose la toma de muestras hasta una semana tras la finalización de la adición de bacterias al pienso.

Las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α se inducen generalmente en etapas tempranas y se utilizan como un indicador de la respuesta inflamatoria en los peces (Pérez-Sánchez *et al.*, 2011b). La interleuquina 1 β , es una citoquina muy importante,

producida por muchos tipos celulares, entre los que se incluyen los monocitos, los macrófagos y los neutrófilos (Huisin, 2004). Por otro lado, el factor de necrosis tumoral (TNF- α) se utiliza como un marcador de la regulación inmunológica, un incremento en su expresión tras la alimentación de animales con probióticos puede traducirse en un estado inmunológico favorable para la resistencia frente a patógenos (Standen *et al.*, 2013). Algunas citoquinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6, TNF- α y COX-2, normalmente se estimulan durante la etapa precoz de la respuesta inmune (Tizard, 1995; Secombes *et al.*, 2001).

En nuestro trabajo, se detectó que la expresión génica de la IL-1 β y TNF- α fue considerablemente mayor en las muestras de bazo de ambos grupos tratados, tras una semana de haber finalizado la administración de las cepas probióticas, al igual que sucedió con la expresión el gen COX-2, considerado como un mediador de la inflamación cuya sobre-expresión se asocia a enfermedades inflamatorias crónicas (Nurmi *et al.*, 2005). En otros casos se ha encontrado la inhibición de la expresión de estas citoquinas, tras alimentar larvas de lubina con lactobacilos (Picchietty *et al.*, 2009). Y ocurrió al contrario con la expresión del gen Mx o proteínas Mx que, a su vez, son efectoras del gen IFN de tipo I, frente a las infecciones virales (Haller y Kochs, 2011). Algunas bacterias probióticas han demostrado tener propiedades para activar este gen (Balcázar *et al.*, 2006). En nuestro caso, las muestras pertenecientes a este órgano en ambos grupos de animales tratados con las cepas probióticas se sub-expresaron con respecto al control. La cepa que más activó la expresión de este gen fue *V. fluvialis* L21.

También se incrementó la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10, identificada inicialmente como "factor inhibidor de la síntesis de citoquinas" (CSIF) (Fiorentino *et al.*, 1989), regula la baja la expresión de otras citocinas, principalmente de TNF- α (Cassatella *et al.*, 1994). Aunque en el primer periodo de la experiencia (15 días) dicha sobre-expresión se limitó a las muestras de bazo del grupo de animales tratado con la cepa *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 y las muestras del hígado del grupo alimentado con el probiótico *Vagococcus fluvialis* L21, una semana tras finalizar la experiencia, se observó un pico muy alto de expresión en las muestras de bazo de ambos grupos de animales tratados con probióticos, en comparación al grupo control (sin probióticos). Estos resultados han sido observados por otros autores anteriormente. Feng *et al.* (2009) detectaron un incremento significativo en la expresión de la IL 10 tras adicionar al alimento las cepas *Lactococcus lactis* Q-8, L

lactis Q-9 y *L. lactis* Z- 2, aisladas del intestino de carpa común (*Cyprinus carpio*), durante un periodo de 8 semanas. Asimismo, la administración dietética de *Bacillus velezensis* durante 28 días, moduló la respuesta inmune en peces, incrementando niveles de expresión de las citoquinas IL-1, IL-10 y TNF- α entre otras (Yi *et al.*, 2018).

Por otro lado, la IL-6 es una citoquina con propiedades tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, que juega un papel fundamental en la respuesta inmune humoral al promover la diferenciación de las células B y a las células productoras de anticuerpos (Wei *et al.*, 2018). Se ha comprobado que en la lubina suele expresarse en las primeras horas tras la infección (Sepulcre *et al.*, 2007). Al observar su cinética de expresión en nuestro ensayo, podemos observar que los resultados son similares a las citoquinas citadas anteriormente. A los 15 días desde el comienzo con la dieta se observa sobre-expresión en las muestras de bazo de los animales alimentados con la cepa probiótica *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1. Sin embargo, una semana tras finalizar la dieta, la sobre-expresión se evidencia también en las muestras de bazo de los animales alimentados con *Vagococcus fluvialis* L21, pero no en los alimentados con la cepa *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1 ya que, en este grupo, la sobre-expresión se produce en las muestras pertenecientes al hígado.

La administración de *Bacillus* spp. en la dieta durante 8 semanas aumentó los niveles de citoquinas proinflamatorias como la IL1 β , TNF- α y también la IL-6 en falso halibut del japon (*Paralichthys olivaceus*) (Hasan *et al.*, 2019).

La Caspasa-3 es la citoquina encargada de cerrar la respuesta inflamatoria (Nagata, 1997). En nuestro ensayo, los valores de expresión de esta citoquina fueron muy variables, pero también muy limitados, como puede apreciarse en la Figura 9, en los distintos periodos analizados. No obstante, fue el día 30 cuando se observaron los mayores niveles de expresión génica, concretamente en las muestras de hígado y riñón de ambos grupos de animales tratados con probióticos. Aunque una semana después de haber finalizado la dieta experimental, también se expresó el gen respecto al control en las muestras de bazo de ambos grupos. Llama la atención que esta citoquina se expresó con una respuesta más leve en todos los tiempos de muestreo y para las dos cepas probióticas utilizadas.

A pesar de que hemos encontrado en este estudio diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la expresión de todas las citoquinas investigadas con respecto al grupo control, éstas no han aparecido de manera regular en los tres órganos investigados ni en todos los momentos de muestreo. El tamaño de la muestra en cada caso tuvo que ser limitado para poder afrontar el diseño completo de este trabajo. Y esta ha podido ser la causa principal de este hecho. También hubiese sido más revelador haber realizado más puntos de muestreo durante la experiencia, pero no era factible, atendiendo a la capacidad de nuestro módulo experimental. Las dos cepas probióticas utilizadas en este estudio han inducido una respuesta proinflamatoria con variado nivel de expresión, especialmente para la IL-1 β , IL-6, IL-10, COX-2 y TNF- α .

Respecto a los ensayos para evaluar la actividad probiótica de la cepa *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 frente a una infección por *E. coli* utilizando un modelo clásico de peritonitis fecaloide en rata, podemos destacar como principales hallazgos de nuestro estudio, que esta cepa aislada de corvina (*A. regius*), es segura y tiene marcados efectos sobre la propagación de la infección en un modelo experimental de peritonitis clínicamente relevante. Hasta donde sabemos, éste es el primer estudio que explora los efectos probióticos de *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* sobre parámetros clínicos, bioquímicos y patológicos en un modelo animal de peritonitis. Por otro lado, se han propuesto algunos géneros bacterianos usados como probióticos que pueden ser patógenos para humanos y para los peces como, por ejemplo, algunas cepas que pertenecen al género *Aeromonas* (Irianto y Austin, 2002).

Diversas especies probióticas han demostrado ser beneficiosas para la salud humana y animal, tanto *in vivo* como *in vitro* (Lazarenko *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Roman *et al.*, 2015; Aceti *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2018; Gancarčiková *et al.*, 2019; Pratt y Campbell, 2019). Aunque las bacterias ácido lácticas han sido el grupo de probióticos más utilizado en medicina humana y veterinaria, cada vez son más frecuentes los estudios que evalúan otras especies bacterianas como posibles bacterias probióticas (Román *et al.*, 2012; Foulquié *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2018; Pabari *et al.*, 2020).

Alcaligenes faecalis subsp. *faecalis* es el miembro de la familia *Alcaligenaceae* más frecuentemente aislado en el laboratorio clínico, y está presente en el suelo y el agua, en la microbiota intestinal humana y en el entorno hospitalario (Tena *et al.*, 2015;

Basharat *et al.*, 2018). Se ha informado de que algunas cepas son causa de infecciones nosocomiales esporádicas (Aisenberg *et al.*, 2004; Kavuncuoglu *et al.*, 2010). Algunos estudios hacen referencia a una respuesta de carácter eosinofílica, relacionada con la alveolitis en humanos causada por inhalaciones de *Alcaligenes faecalis* (Milanowski *et al.*, 1998). Dado que la mayoría de los beneficios para la salud de los probióticos son específicos de la cepa, los riesgos potenciales también son específicos de la cepa. Por lo tanto, generalizar un riesgo para la salud por el uso de determinadas especies bacterianas como agentes probióticos no es correcto, aunque no discutimos que existen ciertos grupos de riesgo, como, por ejemplo, pacientes inmunodeprimidos graves, en los que el uso de determinados probióticos debe ser cuidadosamente vigilado.

Varios estudios experimentales y clínicos informaron de una disminución de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) por diferentes probióticos (Kobyliak *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2019; Neag *et al.*, 2020), pero no hemos encontrado pruebas de una disminución exclusiva de la AST en grupos de animales que recibieron o no los probióticos.

La observación de una disminución significativa de la concentración de *E. coli* después de 7 días de administración de la cepa probiótica *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1, para una posterior recuperación a las concentraciones iniciales una vez que cesa la administración del probiótico, son consistentes con los descritos por otros autores (Liu *et al.*, 2017). Cabe destacar que otros estudios indicaron que la suplementación con *Lactobacillus* spp. e inulina en pollos de engorde, disminuyó el número de *E. coli* y el pH en el íleon y el ciego (Wu *et al.*, 2019). Aunque las razones de esta supresión no están claras, hay dos posibles motivos: (i) la disminución del número de bacterias puede ser el resultado de la inhibición de la proliferación bacteriana, y (ii) una menor infiltración bacteriana o la promoción de la muerte bacteriana (Sokol *et al.*, 2008; Ivanov *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013).

Algunos autores han indicado que la vía de infección puede afectar a la respuesta del hospedador. Una inoculación rápida y abrumadora de bacterias en el peritoneo o en el torrente sanguíneo inicia respuestas rápidas y distintas. Una infección peritoneal inducirá principalmente la migración inflamatoria y de células inmunitarias hacia el compartimento infectado, mientras que un modelo de infección por vía sanguínea tendrá el mayor efecto inmediato sobre el endotelio y el sistema vascular, con la consiguiente propagación a los órganos. En el caso de la inoculación de *E. coli* en la sangre, se observan

cambios rápidos en los niveles de citoquinas en suero. Sin embargo, la inoculación de la cavidad peritoneal con la misma dosis de *E. coli* no genera una respuesta robusta de citoquinas en suero (Buras *et al.*, 2005). Además, se ha demostrado que en la peritonitis infecciosa la actividad de la IL-10 protege a los ratones de la muerte (Van der Poll *et al.*, 1995). Quizá esos efectos, junto con la ligera disminución de la concentración de nuestros inóculos de *E. coli* (Shukla *et al.*, 2014), sean las razones de la nula mortalidad en nuestro estudio.

Nuestro modelo de sepsis fue válido para evaluar la progresión de los animales enfermos. Los animales infectados que no recibieron la cepa probiótica *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1 (IC), mostraron claros signos de malestar, típicos de las infecciones bacterianas, como pelaje erizado, secreción ocular y pérdida de peso (Acred *et al.*, 1994). Al comparar los datos hematológicos y bioquímicos de los animales pretratados con el probiótico e inoculados con *E. coli* (grupo IA), se produjo una marcada reducción de los eosinófilos en sangre, la urea y la ALT. Estos hallazgos podrían estar relacionados con una capacidad antiinflamatoria y/o inmunomoduladora de la cepa probiótica. Aunque no encontramos lesiones histopatológicas inflamatorias en riñón o hígado, sí encontramos una inflamación moderada con infiltrados polimorfonucleares en el peritoneo y en el tejido adiposo de las ratas del grupo control infectado sin probiótico, que se redujeron significativamente en los animales infectados a los que se les suministró previamente la cepa probiótica. Esta mejora inflamatoria a nivel histológico, también se ha demostrado con modelos similares de peritonitis probando diferentes terapias, donde se evaluó el grosor de la superficie peritoneal, la descamación de las células mesoteliales y los infiltrados de células inflamatorias (Uzunköy *et al.*, 2012). La enzima ALT es más específica para el daño hepático que la AST, porque la primera se localiza casi exclusivamente en el citosol del hepatocito, mientras que la AST, además del citosol y las mitocondrias, se encuentra en el corazón, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, eritrocitos y leucocitos (Giannini *et al.*, 2005). Las elevaciones de ALT y urea en nuestro estudio se correlacionan con las obtenidas por otros autores en modelos similares de peritonitis con o sin evaluación probiótica (Lee *et al.*, 2016; Gancarčíková *et al.*, 2019).

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones y puntos fuertes. En primer lugar, un mayor tamaño de la muestra podría proporcionar resultados más sólidos. En segundo lugar, desconocemos los posibles efectos que la cepa probiótica *Alcaligenes faecalis*

subp. *faecalis*-1 puede causar en los animales tras 7 días de su administración y la seguridad y eficacia a diferentes dosis. En tercer lugar, aunque el uso de un sistema de puntuación semicuantitativo, como el utilizado en este estudio para la evaluación histológica, es bastante común, somos conscientes de que dicha puntuación no proporciona una evaluación totalmente cuantitativa de las alteraciones histopatológicas, como lo haría una evaluación morfométrica. Sin embargo, la mayor fortaleza de este estudio es que hemos utilizado un modelo traslacional de peritonitis que nos ha permitido obtener resultados de relevancia clínica con una visión global del potencial papel terapéutico de esta cepa probiótica.

En resumen, nuestros hallazgos sugieren que *Alcaligenes faecalis* subp. *faecalis*-1 podría influir en parámetros clínicamente relevantes en la sepsis. La administración de 6×10^8 UFC/ml durante 7 días se asoció a una menor propagación de la infección. Nuestro estudio puede añadir una pieza al complejo rompecabezas de las interacciones bacteria-hospedador y nuevas posibilidades terapéuticas en la profilaxis de la sepsis. Sin embargo, son necesarios futuros estudios para analizar estos parámetros con más detalle.

A decorative graphic at the top of the page featuring a blue, textured splash or wave pattern that tapers off towards the right. The word "CONCLUSIONES" is centered within this graphic.

CONCLUSIONES

VII.-CONCLUSIONES

PRIMERA.- Con este trabajo hemos conseguido la caracterización *in vitro* de gran cantidad de cepas potencialmente probióticas para la acuicultura, obtenidas a partir de las siguientes especies con relevancia para la acuicultura: lubina (*Dicentrarchus labrax*), corvina (*Argyrosomus regius*) y lenguado (*Solea solea*).

SEGUNDA.- Del total de cepas caracterizadas *in vitro*, destaca sobremanera la cepa *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 aislada de corvina (*Argyrosomus regius*), siendo la candidata idónea para estudios *in vivo* posteriores que completen la caracterización de dicha cepa para la prevención de infecciones bacterianas presentes en la acuicultura marina y continental.

TERCERA.- Las cepas *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 y *Vagococcus fluvialis* L21 parecen modular la respuesta inmune inespecífica en la lubina (*Dicentrarchus labrax*), tras su administración en el pienso por un periodo de 30 días, con variado nivel de expresión, activando citoquinas proinflamatorias, especialmente la IL-1 β , IL-6, IL-10, COX-2 y TNF- α .

CUARTA.- La cepa *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 es segura y tiene marcados efectos sobre la propagación de la infección por *E. coli* en un modelo experimental de peritonitis fecaloide en rata, si bien es cierto que se hacen necesarios futuros estudios para analizar estos, y otros parámetros, con más detalle.

A decorative graphic at the top of the page featuring a blue, textured splash or wave pattern that tapers off towards the right. The word "RESUMEN" is centered within this graphic.

RESUMEN

VIII.-RESUMEN

Tradicionalmente, para el control de las enfermedades de origen infeccioso en acuicultura, se ha recurrido a la utilización de antibióticos como primera opción. Sin embargo, además de no resolver la problemática en sí, su utilización de forma indebida trae consigo numerosas repercusiones negativas, tanto para la salud animal y humana, como para el medio ambiente. Por esta razón, se ha tratado de buscar alternativas eficaces y a la vez sostenibles, como es el uso de los probióticos.

El principal objetivo de este trabajo ha sido obtener nuevas cepas potencialmente probióticas mediante su aislamiento a partir del contenido intestinal y agallas de especies de peces marinos con interés comercial para la acuicultura, como la lubina (*Dicentrarchus labrax*), la corvina (*Argyrosomus regius*) y el lenguado (*Solea solea*). Concretamente, hemos caracterizado e identificado 12 cepas con actividad potencialmente probiótica, de un total de 156 aisladas inicialmente.

Se determinó *in vitro* la capacidad inhibitoria frente al crecimiento de patógenos con interés en acuicultura marina y continental, la producción de sustancias antibacterianas, la resistencia a las sales biliares y a los gradientes de pH, la competición por nutrientes, la hidrofobicidad celular y la adhesión y crecimiento en el mucus intestinal y cutáneo de lubina (*D. labrax*).

Tras la caracterización *in vitro* de las cepas potencialmente probióticas, la cepa *Alcaligenes faecalis* sub. *faecalis*-1, resultó ser una candidata idónea para ser probada en el control de enfermedades infecciosas, tanto en la acuicultura marina como continental, al mostrar excelentes resultados *in vitro* y resultar inocua para los animales. Asimismo, se evaluó su capacidad inmunomoduladora, junto con la cepa probiótica *Vagococcus fluvialis* L21, al determinar sus cinéticas de expresión génica de citoquinas tras su administración a la dieta de un grupo experimental de lubinas.

Además, se comprobó que la cepa *Alcaligenes faecalis* subp *faecalis*-1 era segura y tiene marcados efectos sobre la propagación de la infección por *E. coli* en un modelo experimental de peritonitis fecaloide en rata, si bien es cierto que se hacen necesarios futuros estudios para analizar estos, y otros parámetros, con más detalle.

A decorative graphic at the top of the page featuring a blue water splash or wave effect, with varying shades of blue and white foam, set against a white background.

SUMMARY

IX.-SUMMARY

Traditionally, for the control of infectious diseases in aquaculture, the use of antibiotics has been the first option. However, in addition to not solving the problem itself, its improper use brought with it numerous negative repercussions, both for animal and human health, as well as for the environment. For this reason, an attempt has been made to find effective and sustainable alternatives, such as the use of probiotics.

The main objective of this work has been to obtain new potentially probiotic strains by isolating them from the intestinal content and gills of marine fish species with commercial interest for aquaculture, such as sea bass (*Dicentrarchus labrax*), meagre (*Argyrosomus regius*) and sole (*Solea solea*). Concretely, we have characterized and identified 12 strains with potential probiotic activity, out of a total of 156 initially isolated.

The inhibitory capacity against the growth of pathogens of aquaculture interest, the production of antibacterial substances, resistance to bile salts and pH gradients, competition for nutrients, cell hydrophobicity and adhesion and growth in intestinal and cutaneous mucus of seabass (*D. labrax*) were determined *in vitro*.

After the *in vitro* characterization of the potentially probiotic strains, the strains *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1, proved to be a suitable candidate to be tested in the control of infectious diseases, both in marine and continental aquaculture, as it showed excellent *in vitro* results and was harmless to the animals. Likewise, its immunomodulatory capacity was evaluated, together with the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* L21, by determining its cytokine gene expression kinetics after its administration to the diet of an experimental group of sea bass.

In addition, the strain *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 was found to be safe and to have marked effects on the spread of *E. coli* infection in an experimental rat model of fecaloid peritonitis, although future studies are needed to analyze these and other parameters in more detail.

A decorative graphic at the top of the page consisting of a blue, textured splash or wave pattern that tapers off to the right.

BIBLIOGRAFÍA

X.- BIBLIOGRAFÍA

Abarike, E. D., Jian, J., Tang, J., Cai, J., Yu, H., Lihua, C., y Jun, L. (2018). **Influence of traditional Chinese medicine and *Bacillus* species (TCMBS) on growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*.** *Aquaculture Research*, 49(7), 2366-2375.

Abid, A., Davies, S. J., Waines, P., Emery, M., Castex, M., Gioacchini, G., Camevali, O., Bickerdike, R., Romero, J., y Merrifield, D. L. (2013). **Dietary synbiotic application modulates Atlantic salmon (*Salmo salar*) intestinal microbial communities and intestinal immunity.** *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1948-1956.

Abo-Al-Ela, HG. (2018). **An introduction to selected innate immune-relevant genes in fish.** *Applied Ecology and Environmental Research*, 16(2), 955-976.

Aceti, A., Maggio, L., Beghetti, I., Gori, D., Barone, G., Callegari, M., Fantini, M., Indrio, F., Meneghin, F., Morelli, L., Zuccotti, G., y Corvaglia, L. (2017). **Probiotics prevent late-onset sepsis in human milk-fed, very low birth weight preterm infants: systematic review and meta-analysis.** *Nutrients*, 9(8), 904.

Acosta, F., Lockhart, K., Gahlawat, S. K., Real, F., y Ellis, A. E. (2004). **Mx expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to *Listonella anguillarum* bacterin, lipopolysaccharide and chromosomal DNA.** *Fish & Shellfish Immunology*, 17(3), 255-26.

- Acred, P., Hennessey, T. D., MacArthur-Clark, J. A., Merrikin, D. J., Ryan, D. M., Smulders, H. C., Troke, P. F., Wilson, R. G., y Straughan, D. W. (1994). **Guidelines for the welfare of animals in rodent protection tests: A Report from the Rodent Protection Test Working Party.** *Laboratory Animals*, 28(1), 13-18.
- Adams, C. A. (2010). **The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers.** *Nutrition Research Reviews*, 23(1), 37-46.
- Adnan, M., Patel, M., y Hadi, S. (2017). **Functional and health promoting inherent attributes of *Enterococcus hirae* F2 as a novel probiotic isolated from the digestive tract of the freshwater fish *Catla catla*.** *PeerJ*, 5, e3085.
- Agencia española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) (2015). **Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos.** *Ministerio de sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.*
- Aisenberg, G., Rolston, K. V., y Safdar, A. (2004). **Bacteremia caused by *Achromobacter* and *Alcaligenes* species in 46 patients with cancer (1989–2003).** *Cancer*, 101(9), 2134-2140.
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., y Mohsin, M. (2015). **Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review.** *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 733-741.
- Alejo, A., y Tafalla, C. (2011). **Chemokines in teleost fish species.** *Developmental and Comparative Immunology*, 35(12), 1215-1222.

- Al-Faragi, J. K., y Alsaphar, S. A. (2012). **Isolation and identification of *Bacillus subtilis* as probiotic from intestinal microflora of common carp *Cyprinus carpio* L.** *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*, 36 special issue (2), 355-361.
- Allameh, S. K., Yusoff, F. M., Ringø, E., Daud, H. M., Saad, C. R., Ideris, A. (2015). **Effects of dietary mono- and multiprobiotic strains on growth performance, gut bacteria and body composition of Javanese carp (*Puntius gonionotus*, Bleeker 1850).** *Aquaculture Nutrition*, 22(2), 367-373.
- Altschul, SF, Madden, TL, Schäffer, AA, Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, DJ (1997). **"Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"**, *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
- Amin, A. K. M. R., Tanaka, M., Al-saari, N., Feng, G., Mino, S., Ogura, Y., Hayashi, T., Meirelles, P. M., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Sawabe, T., y Sawabe, T. (2017). ***Thaumasiovibrio occultus* gen. nov. sp. nov. and *Thaumasiovibrio subtropicus* sp. nov. within the family *Vibrionaceae*, isolated from coral reef seawater off Ishigaki Island, Japan.** *Systematic and Applied Microbiology*, 40(5), 290-296.
- Amlashi, A. S., Falahatkar, B., Sattari, M., y Gilani, M. H. T. (2011). **Effect of dietary vitamin E on growth, muscle composition, hematological and immunological parameters of sub-yearling beluga *Huso huso* L.** *Fish & Shellfish Immunology*, 30(3), 807-814.
- Antony, SP y Philip, R. (2006). **Biorremediación en sistemas de cultivo de camarón.** *Naga The WorldFish Center Quarterly*, 29 (3 y 4), 62-66.

APROMAR. (2020). Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos. La acuicultura en España. <http://www.apomar.es/content/informes-anales>.

Arahal, D. R., Sánchez, E., Macián, M. C., y Garay, E. (2008). **Value of recN sequences for species identification and as a phylogenetic marker within the family "Leuconostocaceae"**. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 11(1), 33–39.

Arunachalam, K., Gill, H. S., y Chandra, R. K. (2000). **Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019)**. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54(3), 263-267.

Askarian, F., Kousha, A., Salma, W., y Ringø, E. (2011). **The effect of lactic acid bacteria administration on growth, digestive enzyme activity and gut microbiota in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) fry**. *Aquaculture Nutrition*, 17(5), 488-497.

Aubin, J., Gatesoupe, F.-J., Labbe, L., y Lebrun, L. (2005). **Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)**. *Aquaculture Research*, 36(8), 758-767.

Austin, B., Baudet, E., y Stobie, M. (1992). **Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica***. *Journal of Fish Diseases*, 15(1), 55-61.

Austin, B., Stuckey, L. F., Robertson, P. A. W., Effendi, I., y 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(1), 93-96.

Austin, B., y Austin, D. A. (2012a). **Aeromonadaceae Representative (*Aeromonas salmonicida*)**. *Bacterial Fish Pathogens*, 147-228.

Austin, B., y Austin, D. A. (2012b). **Vibrionaceae Representatives**. *Bacterial Fish Pathogens*, 357-411.

Austin, B., y Austin, D. A. (2016). **Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish**. *Springer, 6th*, 366p.

Avella, M. A., Olivotto, I., Silvi, S., Place, A. R., y Carnevali, O. (2010). **Effect of dietary probiotics on clownfish: a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish**. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298(2), R359-R371.

Balcázar, J. L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Gironés, O., y Múzquiz, J. L. (2007). **In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens**. *Veterinary Microbiology*, 122(3-4), 373-380.

Balcázar, J. L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J. L., y Girones, O. (2008). **Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish**. *Aquaculture*, 278(1-4), 188-191.

Balcázar, J., Blas, I., Ruizzarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., y Muzquiz, J. (2006). **The role of probiotics in aquaculture**. *Veterinary Microbiology*, 114(3-4), 173-186.

- Bandyopadhyay, P., y Das Mohapatra, P. K. (2008). **Effect of a probiotic bacterium *Bacillus circulans* PB7 in the formulated diets: on growth, nutritional quality and immunity of *Catla catla* (Ham.).** *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(3), 467-478.
- Banerjee, G., Nandi, A., y Ray, A. K. (2016). **Assessment of hemolytic activity, enzyme production and bacteriocin characterization of *Bacillus subtilis* LR1 isolated from the gastrointestinal tract of fish.** *Archives of Microbiology*, 199(1), 115-124.
- Banerjee, G., Ray, A. K. (2017). **The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries.** *Research in Veterinary Science*, 115, 66–77.
- Barnes, A. C. (2011). **Enteric redmouth disease (ERM) (*Yersinia ruckeri*).** *Fish diseases and disorders, 3: viral, bacterial and fungal infections*, 484-511.
- Basharat, Z., Yasmin, A., He, T., y Tong, Y. (2018). **Genome sequencing and analysis of *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* MB207.** *Scientific Reports*, 8(1), 1-10.
- Baxter, D. (2007). **Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing.** *Occupational Medicine*, 57(8), 552-556.
- Bengtén, E., Wilson, M., Miller, N., Clem, L. W., Pilström, L., y Warr, G. W. (2000). **Immunoglobulin Isotypes: Structure, Function, and Genetics.** *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 189-219.

- Berglund B (2015). **Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics.** *Infection Ecology and Epidemiology*, 5(1), 28564.
- Bergman, A. M. (1909). **Die rote beulenkrankheit des aals.** *Bericht aus der Koniglichen Bayerischen Versuchsstation*, 2, 10-54.
- Bhatnagar, A., y Lamba, R. (2015). **Antimicrobial ability and growth promoting effects of feed supplemented with probiotic bacterium isolated from gut microflora of Cirrhinus mrigala.** *Journal of Integrative Agriculture*, 14(3), 583-592.
- Bird, S., Zou, J., y Secombes, C. (2006). **Advances in Fish Cytokine Biology Give Clues to the Evolution of a Complex Network.** *Current Pharmaceutical Design*, 12(24), 3051-3069.
- Bizzini, A., y Greub, G. (2010). **Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification.** *Clinical Microbiology and Infection*, 16(11), 1614-1619.
- Blanco, J., Muriel-Bombín, A., Sagredo, V., Taboada, F., Gandía, F., Tamayo, L., Collado, J., García-Labattut, Á., Carriedo, D., Valledor, M., De Frutos, M., López, M.-J., Caballero, A., Guerra, J., Álvarez, B., Mayo, A., y Villar, J. (2008). **Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study.** *Critical Care*, 12(6), R158.

Boutin, S., Audet, C., y Derome, N. (2013). **Probiotic treatment by indigenous bacteria decreases mortality without disturbing the natural microbiota of *Salvelinus fontinalis*.** *Canadian Journal of Microbiology*, 59(10), 662-670.

Bricknell, I., y Dalmo, R. (2005). **The use of immunostimulants in fish larval aquaculture.** *Fish & Shellfish Immunology*, 19(5), 457-472.

Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., y 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(10), 573-579.

Brunt, J., y Austin, B. (2005). **Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).** *Journal of Fish Diseases*, 28(12), 693-701.

Buchinger, T. J., Li, W., y Johnson, N. S. (2014). **Bile Salts as Semiochemicals in Fish.** *Chemical Senses*, 39(8), 647-654.

Buras, J. A., Holzmann, B., y Sitkovsky, M. (2005). **Animal Models of sepsis: setting the stage.** *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(10), 854-865.

Cabello, F. C. (2006). **Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment.** *Environmental Microbiology*, 8(7), 1137-1144.

Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., y Buschmann, A. H. (2013). **Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its**

- relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health.** *Environmental Microbiology*, 15(7), 1917-1942.
- Cahill, M. M. (1990). **Bacterial flora of fishes: A review.** *Microbial Ecology*, 19(1), 21-41.
- Canestrini, G. (1893). **La malattia dominante delle anguille.** *Atti Institute Veneto Service*, 7, 809-814.
- Capkin, E., y Altinok, I. (2009). **Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease.** *Journal of Applied Microbiology*, 106(4), 1147-1153.
- Carnevali, O., de Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S., y 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(1-4), 430-438.
- Carnevali, O., Zamponi, M. C., Sulpizio, R., Rollo, A., Nardi, M., Orpianesi, C., Silvi, S., Caggiano, M., Polzonetti, A. M., y Cresci, A. (2004). **Administration of Probiotic Strain to Improve Sea Bream Wellness during Development.** *Aquaculture International*, 12 (4/5), 377-386.
- Cassatella, M. A., Meda, L., Gasperini, S., Calzetti, F., y Bonora, S. (1994). **Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation.** *Journal of Experimental Medicine*, 179(5), 1695-1699.

- Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Coutinho, F., Pousão-Ferreira, P., Brandão, T. M., Oliveira-Teles, A., y Peres, H. (2013). **Digestive enzymes of meagre (*Argyrosomus regius*) and white seabream (*Diplodus sargus*). Effects of dietary brewer's spent yeast supplementation.** *Aquaculture*, 416-417, 322-327.
- Chabrillón, M., Arijo, S., Diaz-Rosales, P., Balebona, M. C., y Morinigo, M. A. (2006). **Interference of *Listonella anguillarum* with potential probiotic microorganisms isolated from farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.).** *Aquaculture Research*, 37(1), 78-86.
- Chabrillón, M., Rico, R. M., Arijo, S., Diaz-Rosales, P., Balebona, M. C., y Morinigo, 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 (9), 531-537.
- Chang, C.-I., y 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(5), 311-315.
- Chart, H. (2012). ***Vibrio, mobiluncus, gardnerella* and *spirillum*: Cholera; vaginosis; rat bite fever.** *In Medical Microbiology* (pp. 314-323).
- Chauhan, A., y Singh, R. (2018). **Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach.** *Symbiosis*, 77 (2), 99-113.

- Chen, F.-R., Liu, P.-C., y Lee, K.-K. (2000). **Lethal Attribute of Serine Protease Secreted by *Vibrio alginolyticus* Strains in Kuruma Prawn *Penaeus japonicus*.** *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55 (1-2), 94-99.
- Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L., y Yuan, Z. (2014). **Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry?.** *Frontiers in Microbiology*, 5, 217.
- Christensen, H. R., Frøkiær, H., y Pestka, J. J. (2002). **Lactobacilli Differentially Modulate Expression of Cytokines and Maturation Surface Markers in Murine Dendritic Cells.** *The Journal of Immunology*, 168 (1), 171-178.
- Chu, W.-M. (2013). **Tumor necrosis factor.** *Cancer Letters*, 328 (2), 222-225.
- Collado, M. C., Grześkowiak, Ł., y Salminen, S. (2007). **probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa.** *Current Microbiology*, 55(3), 260-265.
- Croxatto, A., Prod'hom, G., y Greub, G. (2012). **Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology.** *FEMS Microbiology Reviews*, 36 (2), 380-407.
- D**allaire-Dufresne, S., Tanaka, K. H., Trudel, M. V., Lafaille, A., y Charette, S. J. (2014). **Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis.** *Veterinary Microbiology*, 169 (1-2), 1-7.

- Dawood, M. A. O., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., El Basuini, M. F., Hossain, M. S., Nhu, T. H., Moss, A. S., Dossou, S., y Wei, H. (2015). **Dietary supplementation of β -glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*.** *Aquaculture Nutrition*, 23 (1), 148-159.
- Dawood, M. A. O., Koshio, S., y Esteban, M. Á. (2017). **Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review.** *Reviews in Aquaculture*, 10 (4), 950-974.
- Dawood, M. A. O., y Koshio, S. (2016). **Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review.** *Aquaculture*, 454, 243-251.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., y Verstraete, W. (2004). **Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture.** *Aquaculture*, 240 (1-4), 69-88.
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., y Bossier, P. (2011). **Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture.** *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 251-258.
- Denev, S., Beev, G., Staykov, Y., y Moutafchieva, R. (2009). **Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture.** *International aquatic research*, 1(1), 1-29.
- Dierckens, K., Rekecki, A., Laureau, S., Sorgeloos, P., Boon, N., Van den Broeck, W., y Bossier, P. (2009). **Development of a bacterial challenge test for gnotobiotic**

sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Environmental Microbiology*, 11 (2), 526-533.

Dong, H. T., Taengphu, S., Sangsuriya, P., Charoensapsri, W., Phiwsaiya, K., Sornwatana, T., Khunrae, P., Rattanarojpong, T., y Senapin, S. (2017). **Recovery of *Vibrio harveyi* from scale drop and muscle necrosis disease in farmed barramundi, *Lates calcarifer* in Vietnam.** *Aquaculture*, 473, 89-96.

Dongarrà, M. L., Rizzello, V., Muccio, L., Fries, W., Cascio, A., Bonaccorsi, I., y Ferlazzo, G. (2012). **Mucosal Immunology and Probiotics.** *Current Allergy and Asthma Reports*, 13 (1), 19-26.

Dos Santos, N. M. S., Taverne-Thiele, J. J., Barnes, A. C., van Muiswinkel, W. B., Ellis, A. E., y Rombout, J. H. W. M. (2001). **The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* bacterin: an ontogenetic study.** *Fish & Shellfish Immunology*, 11(1), 65-74.

Dutta, D., y Ghosh, K. (2015). **Screening of extracellular enzyme-producing and pathogen inhibitory gut bacteria as putative probiotics in mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822).** *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2(4), 310-318.

Escobar, B., Olvera, M., y Puerto, C. 2006 **Avances sobre la Ecología Microbiana del tracto digestivo de la Tilapia y sus Potenciales Implicaciones.** Avances en nutrición acuícola VIII. VII *Simposium Internacional de nutrición acuícola*. ISBN 970-694-333-5

Etyemez, M., y Balcázar, J. L. (2016). **Isolation and characterization of bacteria with antibacterial properties from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. *Research in Veterinary Science*, 105, 62-64.

FAO. (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. Roma. ISBN 978-92-5-130688-8.

FAO. (2020). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción*. Roma. ISBN 978-92-5-132756-2

Feng, J., Chang, X., Zhang, Y., Yan, X., Zhang, J., y Nie, G. (2019). **Effects of *Lactococcus lactis* from *Cyprinus carpio* L. as probiotics on growth performance, innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila***. *Fish & Shellfish Immunology*, 93, 73-81.

Ferguson, R. M. W., Merrifield, D. L., Harper, G. M., Rawling, M. D., Mustafa, S., Picchietti, S., Balcázar, J. L., y 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(3), 851-862.

Fiorentino, D. F., Bond, M. W., y Mosmann, T. R. (1989). **Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones**. *Journal of Experimental Medicine*, 170(6), 2081-2095.

Firmino, J., Furones, M. D., Andree, K. B., Sarasquete, C., Ortiz-Delgado, J. B., Asencio-Alcudia, G., y Gisbert, E. (2019). **Contrasting outcomes of *Vibrio harveyi***

pathogenicity in gilthead seabream, (*Sparus aurata*) and European seabass, (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 511, 734210.

Fjellheim, A. J., Klinkenberg, G., Skjermo, J., Aasen, I. M., y Vadstein, O. (2010).

Selection of candidate probiotics by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Veterinary Microbiology*, 144(1-2), 153-159.

Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., y De Vuyst, L. (2006). **The**

role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1), 1-24.

Fukami, K., Nishijima, T. y Ishida, Y.(1997) **Stimulative and inhibitory effects of**

bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiologia*, 358, 185–191.

Fuller, R. 1989. **Probiotics in man and animals.** *Journal Applied Bacteriology* 66, 365-

378.

Gancarčíková, S. ě., Nemcová, R., Popper, M., Hrčková, G., Sciranková, Ľ., Maďar,

M., Mudroňová, D., Vilček, Š., y Žitňan, R. (2019). **The Influence of Feed-Supplementation with Probiotic Strain *Lactobacillus reuteri* CCM 8617 and Alginate on Intestinal Microenvironment of SPF Mice Infected with *Salmonella Typhimurium* CCM 7205.** *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(2), 493-508.

Gao, C., Ganesh, B. P., Shi, Z., Shah, R. R., Fultz, R., Major, A., Venable, S., Lugo, M.,

Hoch, K., Chen, X., Haag, A., Wang, T. C., y Versalovic, J. (2017). **Gut Microbe–Mediated Suppression of Inflammation-Associated Colon**

Carcinogenesis by Luminal Histamine Production. *The American Journal of Pathology*, 187(10), 2323-2336.

Garcés, M.E. (2018). **Capacidad probiótica de microorganismos autóctonos de patagonia para el control de patógenos de usual o currencia en acuicultura.** – (Tesis Doctoral). Universidad Nacional del Comahue Centro Regional Universitario Bariloche.

García de la Banda, I., Chereguini, O., y Rasines, I. (1992). **Influencia de la adición de bacterias lácticas en el cultivo larvario del rodaballo (*Schophthalmus maximus* L.).** *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, 8(2), 247-254.

García de La Banda, I., Lobo, C., León-Rubio, J. M., Tapia-Paniagua, S., Balebona, M. C., Moriño, 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(1-4), 281-288.

García, M. A., Iglesias, J. C. F., Rotaeche, A. A., y Sánchez, M. S. (2018). **Bacteriemia, sepsis y shock séptico.** *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(52), 3066-3075.

García-Laorden, M. I., Stroo, I., Terpstra, S., Florquin, S., Medema, J. P., de Vos, A. F., y van der Poll, T. (2017). **Expression and Function of Granzymes A and B in *Escherichia coli* Peritonitis and Sepsis.** *Mediators of Inflammation*, 2017, 1-11.

- Gatesoupe, F. J. (1999). **The use of probiotics in aquaculture.** *Aquaculture*, 180(1-2), 147-165.
- Gatesoupe, F.-J. (1994). **Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus* against pathogenic vibrio.** *Aquatic Living Resources*, 7(4), 277-282.
- Gatesoupe, F.-J. (2002). **Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*.** *Aquaculture*, 212 (1-4), 347-360.
- Ghosh, K., Sen, S. K., y Ray, A. K. (2004). **Growth and survival of rohu, *Labeo rohita* [Hamilton, 1822] spawn fed diets fermented with intestinal bacterium, *Bacillus circulans*.** *Acta Ichthyologica et piscatoria*, 2 (34).
- Giannini, E. G., Testa, R., y Savarino, V. (2005). **Liver enzyme alteration: a guide for clinicians.** *Canadian Medical Association journal*, 172(3), 367–379.
- Gildberg, A., Johansen, A., y 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 (1-4), 23-34.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E., y Ringø, E. (1997). **Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*).** *Hydrobiologia*, 352 (1-3), 279-285.
- Gildberg, A., y 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 (1-2), 103-113.
- Giri, S. S., Sukumaran, V., Sen, S. S., Vinumonia, J., Banu, B. N., y Jena, P. K. (2011). **Antagonistic Activity of Cellular Components of Potential Probiotic Bacteria, Isolated from the Gut of *Labeo rohita*, Against *Aeromonas hydrophila*.** *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 3 (3-4), 214-222.
- Gobeli, S., Goldschmidt-Clermont, E., Frey, J., y Burr, S. E. (2009). ***Pseudomonas chlororaphis* strain JF3835 reduces mortality of juvenile perch, *Perca fluviatilis* L., caused by *Aeromonas sobria*.** *Journal of Fish Diseases*, 32 (7), 597-602.
- Gómez, G. D., y Balcázar, J. L. (2008). **A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish.** *Immunology and Medical Microbiology*, 52 (2), 145-154.
- Graham, S., y Secombes, C. J. (1990). **Do fish lymphocytes secrete interferon-gamma?.** *Journal of Fish Biology*, 36 (4), 563-573.
- Gram, L., Løvold, T., Nielsen, J., Melchiorson, J., y 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 (1-2), 1-11.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., y Nielsen, T. F. (1999). **Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish.** *Applied and environmental microbiology*, 65 (3), 969-973.

- H**aenen, O. L. M.; Fouz Rodríguez, Belén; Amaro González, Carmen; Isern, M. M.; Mikkelsen, H.; Zrnčić, S.; Travers, M. A.; Renault, T.; Wardle, R.; Hellström, A.; y Dalsgaard, I. (2014). **Vibriosis in aquaculture**. *16th EAFP Conference, Tampere, Finland, 4th September 2013*, 34 (4), 138-148.
- Hagi, T., y Hoshino, T. (2009). **Screening and Characterization of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria from Cultured Common Carp Intestine**. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73 (7), 1479-1483.
- Hai, N.V. (2015a). **Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: A review**. *Fish & Shellfish Immunology*, 45 (2), 592-597.
- Hai, N.V. (2015b). **The use of probiotics in aquaculture**. *Journal of Applied Microbiology*, 119 (4), 917-935.
- Haller, O., y Kochs, G. (2011). **Human MxA Protein: An Interferon-Induced Dynamin-Like GTPase with Broad Antiviral Activity**. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31(1), 79-87.
- Han, B., Long, W., He, J., Liu, Y., Si, Y., y Tian, L. (2015). **Effects of dietary *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunological parameters, intestinal morphology and resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections**. *Fish & Shellfish Immunology*, 46 (2), 225-231.
- Hansen, G. H., y Olafsen, J. A. (1999). **Bacterial Interactions in Early Life Stages of Marine Cold Water Fish**. *Microbial Ecology*, 38 (1), 1-26.

- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., y Heo, M.-S. (2010). **Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV).** *Fish & Shellfish Immunology*, 29 (5), 868-874.
- Hasan, M. T., Jang, W. J., Lee, B.-J., Kim, K. W., Hur, S. W., Lim, S. G., Bai, S. C., y Kong, I.-S. (2019). **Heat-killed *Bacillus* sp. SJ-10 probiotic acts as a growth and humoral innate immunity response enhancer in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).** *Fish & Shellfish Immunology*, 88, 424-431.
- Havenaar, R., y Huis In't Veld, J. H. J. (1992). **Probiotics: A General View.** *The Lactic Acid Bacteria*, 1, 151-170.
- Hecker, A., Reichert, M., Reuß, C. J., Schmoch, T., Riedel, J. G., Schneck, E., Padberg, W., Weigand, M. A., y Hecker, M. (2019). **Intra-abdominal sepsis: new definitions and current clinical standards.** *Langenbeck's Archives of Surgery*, 404(3), 257-271.
- Hickey, M. E., y Lee, J. L. (2018). **A comprehensive review of *Vibrio (Listonella) anguillarum*: ecology, pathology and prevention.** *Reviews in Aquaculture*, 10 (3), 585-610.
- Hjelm, M., Bergh, Ø., Riaza, A., Nielsen, J., Melchiorsen, J., Jensen, S., Duncan, H., Ahrens, P., Birkbeck, H., y Gram, L. (2004). **Selection and Identification of Autochthonous Potential Probiotic Bacteria from Turbot Larvae (*Scophthalmus maximus*) Rearing Units.** *Systematic and Applied Microbiology*, 27 (3), 360-371.

- Hoseinifar, S. H., Dadar, M., y Ringø, E. (2017). **Modulation of nutrient digestibility and digestive enzyme activities in aquatic animals: The functional feed additives scenario.** *Aquaculture Research*, 48 (8), 3987-4000.
- Hoseinifar, S. H., Sun, Y.-Z., Wang, A., y Zhou, Z. (2018). **Probiotics as Means of Diseases Control in Aquaculture, a Review of Current Knowledge and Future Perspectives.** *Frontiers in Microbiology*, 9, 2429.
- Hoshina, T. (1958). **A Streptococcus pathogenic to fish.** *Journal of Tokyo University of Fisheries*, 44, 57-68.
- Hu, Y., Li, Y., Li, Z., Chen, C., Zang, J., Li, Y., y Kong, X. (2020). **Novel insights into the selective breeding for disease resistance to vibriosis by using natural outbreak survival data in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*).** *Aquaculture*, 529, 735670.
- Huang, H., Lin, Z., Zeng, Y., Lin, X., y Zhang, Y. (2019). **Probiotic and glutamine treatments attenuate alcoholic liver disease in a rat model.** *Experimental and Therapeutic Medicine*, 4733-4739.
- Huising, M. (2004). **The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish.** *Developmental & Comparative Immunology*, 28(5), 395-413.
- I**brahim, M. D. (2015). **Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives.** *Journal of Advanced Research*, 6 (6), 765-791.

- Ina-Salwany, M. Y., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F., Mohd-Aris, A., Amal, M. N. A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., y Zamri-Saad, M. (2018). **Vibriosis in Fish: A Review on Disease Development and Prevention.** *Journal of Aquatic Animal Health*, 31 (1), 3-22.
- Irianto, A., y Austin, B. (2002). **Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).** *Journal of Fish Diseases*, 25 (6), 333-342.
- Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A., Lynch, S. V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., y Littman, D. R. (2009). **Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria.** *Cell*, 139(3), 485-498.
- Janda, J.M., y Abbott, S. (2010). **The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection.** *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 35-73.
- Ji, Q., Wang, S., Ma, J., y Liu, Q. (2020). **A review: Progress in the development of fish *Vibrio* spp. vaccines.** *Immunology Letters*, 226, 46-54.
- Jöborn, A., Olsson, J. C., Westerdahl, A., Conway, P. L., y Kjelleberg, S. (1997). **Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1.** *Journal of Fish Diseases*, 20 (5), 383-392.

- K**amei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y., y Kimura, T. (1988). **Screening of bacteria with antiviral activity from fresh water salmonid hatcheries.** *Microbiology and immunology*, 32 (1), 67-73.
- Kavuncuoglu, F., Unal, A., Oguzhan, N., Tokgoz, B., Oymak, O., y Utas, C. (2010). **First reported case of *Alcaligenes faecalis* peritonitis.** *Peritoneal Dialysis International*, 30(1), 118-119.
- Kelly, C., y Salinas, I. (2017). **Under Pressure: Interactions between Commensal Microbiota and the Teleost Immune System.** *Frontiers in Immunology*, 8, 559.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., y Gibson, L. (2008). **Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes.** *Aquaculture*, 274 (1), 1-14.
- Khailova, L., Baird, C. H., Rush, A. A., Barnes, C., y Wischmeyer, P. E. (2017). ***Lactobacillus rhamnosus* GG treatment improves intestinal permeability and modulates inflammatory response and homeostasis of spleen and colon in experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia.** *Clinical Nutrition*, 36(6), 1549-1557.
- Kim, D.-H., y Austin, B. (2008). **Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine.** *Letters in Applied Microbiology*, 47 (3), 141-147.
- Kim, O.-S., Cho, Y.-J., Lee, K., Yoon, S.-H., Kim, M., Na, H., Park, S.-C., Jeon, Y. S., Lee, J.-H., Yi, H., Won, S., y Chun, J. (2012). **Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that**

represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62 (Pt_3), 716-721.

Knipe, H., Temperton, B., Lange, A., Bass, D., y Tyler, C. R. (2020). **Probiotics and competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture.** *Reviews in Aquaculture*, 1-29.

Kobyliak, N., Abenavoli, L., Mykhalchyshyn, G., Kononenko, L., Boccuto, L., Kyriienko, D., y Dynnyk, O. (2018). **A multi-strain probiotic reduces the fatty liver index, cytokines and aminotransferase levels in NAFLD patients: Evidence from a randomized clinical trial.** *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 27(1), 41-49.

Krishnan, R. (2014). **Probiotic potential of *Bacillus* species isolated from freshwater fish *Anabas testudineus* in *Labeo rohita*.** *International Journal Research Development*, 1, 46-50.

Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M., y El-Matbouli, M. (2015). ***Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish.** *Veterinary Research*, 46 (1), 2-6.

Lafferty, K. D., Harvell, C. D., Conrad, J. M., Friedman, C. S., Kent, M. L., Kuris, A. M., Powell, E. N., Rondeau, D., y Saksida, S. M. (2015). **Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics.** *Annual Review of Marine Science*, 7 (1), 471-496.

- Laganà, P., Caruso, G., Minutoli, E., Zacccone, R. y Delia, S. (2011). **Susceptibility to antibiotics of *Vibrio* spp. and *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* strains isolated from Italian aquaculture farms.** *New microbiologica*, 34(1), 53-63.
- Laing, K. (2004). **Chemokines.** *Developmental and Comparative Immunology*, 28 (5), 443-460.
- Lakshmi, B., Viswanath, B., y Sai Gopal, D. V. R. (2013). **Probiotics as Antiviral Agents in Shrimp Aquaculture.** *Journal of Pathogens*, 2013, 1-13.
- LaPatra, S. E., Fehring, T. R., y Cain, K. D. (2014). **A probiotic *Enterobacter* sp. provides significant protection against *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after injection by two different routes.** *Aquaculture*, 433, 361-366.
- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M. A., Guzmán-Méndez, B.E., y López-Madrid, W. (2003). **Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Aquaculture*, 216 (1-4), 193-201.
- Lategan, M. J., Torpy, F. R., y Gibson, L. F. (2004a). **Biocontrol of saprolegniosis in silver perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell) by *Aeromonas media* strain A199.** *Aquaculture*, 235(1-4), 77-88.
- Lategan, M. J., Torpy, F. R., y Gibson, L. F. (2004b). **Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas media* strain A199.** *Aquaculture*, 240 (1-4), 19-27.

- Lategan, M. J., y Gibson, L. F. (2003). **Antagonistic activity of *Aeromonas media* strain A199 against *Saprolegnia* sp., an opportunistic pathogen of the eel, *Anguilla australis* Richardson.** *Journal of Fish Diseases*, 26 (3), 147-153.
- Lauzon, H. L., Gudmundsdottir, S., Steinarsson, A., Oddgeirsson, M., Martinsdottir, E., y Gudmundsdottir, B. K. (2010). **Impact of probiotic intervention on microbial load and performance of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles.** *Aquaculture*, 310 (1-2), 139-144.
- Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., Rajan, B., Brinchmann, M. F., y Kiron, V. (2010). **Characterization of GP21 and GP12: Two Potential Probiotic Bacteria Isolated from the Gastrointestinal Tract of Atlantic Cod.** *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2 (2), 126-134.
- Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., y Estante, E. G. (2015). **Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions.** *Fish & Shellfish Immunology*, 45 (1), 2-12.
- Lazado, C. C., y Caipang, C. M. A. (2014a). **Atlantic cod in the dynamic probiotics research in aquaculture.** *Aquaculture*, 424-425, 53-62.
- Lazado, C. C., y Caipang, C. M. A. (2014b). **Mucosal immunity and probiotics in fish.** *Fish & Shellfish Immunology*, 39 (1), 78-89.
- Lazarenko, L., Babenko, L., Sichel, L. S., Pidgorskyi, V., Mokrozub, V., Voronkova, O., y Spivak, M. (2012). **Antagonistic action of Lactobacilli and Bifidobacteria in relation to *Staphylococcus aureus* and their influence on the immune**

- response in cases of intravaginal Staphylococcosis in mice.** *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(2), 78-89.
- Lee, M. J., Kim, K., Jo, Y. H., Lee, J. H., y Hwang, J. E. (2016). **Dose-dependent mortality and organ injury in a cecal slurry peritonitis model.** *Journal of Surgical Research*, 206(2), 427-434.
- Lilly, D. M., y Stillwell, R. H. (1965). **Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms.** *Science*, 147 (3659), 747-748.
- Lin, C.-H., Christopher John, J. A., Lin, C.-H., y Chang, C.-Y. (2006). **Inhibition of nervous necrosis virus propagation by fish Mx proteins.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351 (2), 534-539.
- Liu, C.-H., Chiu, C.-H., Wang, S.-W., y Cheng, W. (2012). **Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*.** *Fish & Shellfish Immunology*, 33 (4), 699-706.
- Liu, D. Q., Gao, Q. Y., Liu, H. B., Li, D. H., y Wu, S. W. (2013). **Probiotics improve survival of septic rats by suppressing conditioned pathogens in ascites.** *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(25), 4053–4059.
- Liu, D.-Q. (2013). **Probiotics improve survival of septic rats by suppressing conditioned pathogens in ascites.** *World Journal of Gastroenterology*, 19(25), 4053.
- Liu, Q., Ni, X., Wang, Q., Peng, Z., Niu, L., Wang, H., Zhou, Y., Sun, H., Pan, K., Jing, B., y Zeng, D. (2017). ***Lactobacillus plantarum* BSGP201683 Isolated from**

Giant Panda Feces Attenuated Inflammation and Improved Gut Microflora in Mice Challenged with Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-12.

Liu, S., Li, E., Cai, Y., Wang, S., Ren, Z., Li, Q., Guo, W., Wu, Y., y Zhou, Y. (2018).

Isolation, identification and pathogenicity characterization of *Vibrio ponticus* from the golden pompano *Trachinotus ovatus*. *Aquaculture*, 496, 285-290.

Liu, V., Escobar, GJ, Greene, JD, Soule, J., Whippy, A., Angus, DC e Iwashyna, TJ

(2014). **Muertes hospitalarias en pacientes con sepsis de 2 cohortes independientes.** *Jama*, 312 (1), 90-92.

Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). **Analysis of Relative Gene Expression Data**

Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25 (4), 402-408.

Llewellyn, A., y Foey, A. (2017). **Probiotic modulation of innate cell pathogen sensing**

and signaling events. *Nutrients*, 9(10), 1156.

Luis Balcázar, J., Decamp, O., Vendrell, D., De Blas, I., y Ruiz-Zarzuela, I. (2006).

Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 18 (2), 65-70.

Magnadottir, B. (2006). **Innate immunity of fish (overview).** *Fish & Shellfish*

Immunology, 20 (2), 137-151.

Magnadottir, B. (2010). **Immunological Control of Fish Diseases.** *Marine*

Biotechnology, 12 (4), 361-379.

- Makridis, P., Martins, S., Vercauteren, T., Van Driessche, K., Decamp, O., y 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 (4), 274-277.
- Mancuso, M., Genovese, M., Guerrera, M.C., Casella, G., Genovese, L., Piccolo, G., y Maricchiolo, G. (2015a). **First episode of vibriosis in wild specimens of *Pagellus bogaraveo* (Brünnich, 1768) in the Mediterranean Sea.** *Cahiers de Biologie Marine*. 56, 355–361.
- Mancuso, M., Rappazzo, A. C., Genovese, M., El Hady, M., Ghonimy, A., Ismail, M. Reda R., Cappello S., Genovese L., y Maricchiolo, G. (2015b). **In vitro selection of bacteria and isolation of Probiotics from farmed *Sparus aurata* with potential for use as probiotics.** *International Journal of Animal Biology*, 1 (4), 93-98.
- Manning, T. S., y Gibson, G. R. (2004). **Prebiotics.** *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 18 (2), 287-298.
- Mardones, F. O., Paredes, F., Medina, M., Tello, A., Valdivia, V., Ibarra, R., Correa, J., y Gelcich, S. (2018). **Identification of research gaps for highly infectious diseases in aquaculture: The case of the endemic *Piscirickettsia salmonis* in the Chilean salmon farming industry.** *Aquaculture*, 482, 211-220.
- Marteau, P. (2011). **Evidence of probiotic strain specificity makes extrapolation of results impossible from a strain to another, even from the same species.** *Ann Gastroenterol Hepatol*, 2 (1).

- Martín-Barrasa, J. L., Cordovez, C. M., Zayas, A. E. M., Ana, M. ^a. C. J. S., Varas, B. C., Herráez Thomas, P., Benitez, A. B., Montoya-Alonso, J. A., García-Bello, M., Campelo, F. A., y Tejedor-Junco, M. T. (2015). **Rectal pre-treatment with ozonized oxygen (O₃) aggravates clinic status in septic rats treated with amoxicillin/clavulanate.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(7), 469-475.
- Martín, R., Chain, F., Miquel, S., Motta, J.-P., Vergnolle, N., Sokol, H., y Langella, P. (2017). **Using murine colitis models to analyze probiotics–host interactions.** *FEMS Microbiology Reviews*, 41(Supp_1), S49-S70.
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Herмосillo, O. A., y Ramírez Saad, H. C. (2012). **Use of Probiotics in Aquaculture.** *ISRN Microbiology*, 1-13.
- Mattos-Guaraldi, A. L., Formiga, L. C. D., y Andrade, A. F. B. (1999). **Cell Surface Hydrophobicity of Sucrose Fermenting and Nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* Strains Evaluated by Different Methods.** *Current Microbiology*, 38(1), 37-42.
- Medellin-Peña, M. J., Wang, H., Johnson, R., Anand, S., y Griffiths, M. W. (2007). **Probiotics Affect Virulence-Related Gene Expression in *Escherichia coli* O157:H7.** *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (13), 4259-4267.
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T. M., Bøggwald, J., Castex, M., y Ringø, E. (2010). **The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids.** *Aquaculture*, 302 (1-2), 1-18.

- Milanowski, J., Dutkiewicz, J., Potoczna, H., Kuś, L., y Urbanowicz, B. (1998). **Allergic alveolitis among agricultural workers in eastern Poland: a study of twenty cases.** *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*, 5(1), 31–43.
- Mohamad, N., Amal, M. N. A., Yasin, I. S. M., Zamri Saad, M., Nasruddin, N. S., Alsaari, N., Mino, S., y Sawabe, T. (2019). **Vibriosis in cultured marine fishes: a review.** *Aquaculture*, 512, 734289.
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., DeBoeck, G., y Mohanta, K. N. (2012). **Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention.** *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97 (3), 405-430.
- Montel Mendoza, G., Pasteris, S. E., Ale, C. E., Otero, M. C., Bühler, M. I., y Nader-Macías, M. E. F. (2012). **Cultivable microbiota of *Lithobates catesbeianus* and advances in the selection of lactic acid bacteria as biological control agents in raniculture.** *Research in Veterinary Science*, 93(3), 1160-1167.
- Msangi, S y Batka, M. (2015). **Dietary Change and Global Drivers of Change: How Can We improve the Nutritional Status of the Bottom Billion?.** *Food Security in an Uncertain World*, 15, 243-254.
- Mukherjee, A., Chandra, G., y Ghosh, K. (2019). **Single or conjoint application of autochthonous *Bacillus* strains as potential probiotics: Effects on growth, feed utilization, immunity and disease resistance in Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton).** *Aquaculture*, 512, 734302.
- Mukherjee, A., Dutta, D., Banerjee, S., Ringø, E., Breines, E. M., Hareide, E., Chandra, G., y Ghosh, K. (2016). **Potential probiotics from Indian major carp,**

- Cirrhinus mrigala*. Characterization, pathogen inhibitory activity, partial characterization of bacteriocin and production of exoenzymes. *Research in Veterinary Science*, 108, 76-84.**
- Nagata, S. (1997). **Apoptosis by Death Factor.** *Cell*, 88(3), 355-365.
- Naviner, M., Bergé, J.-P., Durand, P., y Le Bris, H. (1999). **Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens.** *Aquaculture*, 174(1-2), 15-24.
- Nayak, S. K. (2010a). **Probiotics and immunity: A fish perspective.** *Fish & Shellfish Immunology*, 29(1), 2-14.
- Nayak, S. K. (2010b). **Role of gastrointestinal microbiota in fish.** *Aquaculture Research*, 41(11), 1553-1573.
- Neag, M. A., Catinean, A., Muntean, D. M., Pop, M. R., Bocsan, C. I., Botan, E. C., y Buzoianu, A. D. (2020). **Probiotic *Bacillus* Spores Protect Against Acetaminophen Induced Acute Liver Injury in Rats.** *Nutrients*, 12(3), 632.
- Neilands, J. B. (1981). **Iron Absorption and Transport in Microorganisms.** *Annual Review of Nutrition*, 1(1), 27-46.
- Nemzek, J. A., Xiao, H.-Y., Minard, A. E., Bolgos, G. L., y Remick, D. G. (2004). **Humane Endpoints in Shock Research.** *Shock*, 21(1), 17-25.
- Newaj-Fyzul, A., y Austin, B. (2014). **Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases.** *Journal of Fish Diseases*, 38(11), 937-955.

- Nicklas, W., Baneux, P., Boot, R., Decelle, T., Deeny, A. A., Fumanelli, M., e Illgen-Wilcke, B. (2002). **Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units.** *Laboratory Animals*, 36(1), 20-42.
- Nikolopoulou, D., Moutou, K. A., Fountoulaki, E., Venou, B., Adamidou, S., y Alexis, M. N. (2011). **Patterns of gastric evacuation, digesta characteristics and pH changes along the gastrointestinal tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.).** *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 158(4), 406-414.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A. C., Bylund, G., Salminen, S., y Lilius, E.-M. (2003). **Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*).** *Fish & Shellfish Immunology*, 15(5), 443-452.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., y Bylund, G. (2001a). **Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*.** *Aquaculture*, 198(3-4), 229-236.
- Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G., y Ouwehand, A. C. (2001b). **Characterization of the Properties of Human- and Dairy-Derived Probiotics for Prevention of Infectious Diseases in Fish.** *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2430-2435.

Nogami, K., Hamasaki, K., Maeda, M., y Hirayama, K. (1997). **Biocontrol method in aquaculture for rearing the swimming crab larvae *Portunus trituberculatus*.** *Live Food in Aquaculture*, 291-295.

Nurhajati, J., Aryantha, I. N. P., e Indah, D. G. (2012). **The curative action of *Lactobacillus plantarum* FNCC 226 to *Saprolegnia parasitica* A3 on catfish (*Pangasius hypophthalmus* Sauvage).** *International Food Research Journal*, 19(4).

Nurmi, J. T., Puolakkainen, P. A., y Rautonen, N. E. (2005). ***Bifidobacterium Lactis* sp. 420 Up-Regulates Cyclooxygenase (Cox)-1 and Down-Regulates Cox-2 Gene Expression in a Caco-2 Cell Culture Model.** *Nutrition and Cancer*, 51(1), 83-92.

Ocaña, V. S., Bru, E., Ruiz Holgado, A. A. P., y Nader-Macias, M. E. (1999). **Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina.** *The Journal of General and Applied Microbiology*, 45(5), 203-212.

Oliva-Teles, A. (2012). **Nutrition and health of aquaculture fish.** *Journal of Fish Diseases*, 35(2), 83-108.

Olsson, J.C., Westerdahl, A., Conway, P.L., y 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(2), 551–556.

- P**abari, K., Pithva, S., Kothari, C., Purama, R. K., Kondepudi, K. K., Vyas, B. R. M., Kothari, R., y Ambalam, P. (2020). **Evaluation of Probiotic Properties and Prebiotic Utilization Potential of *Weissella paramesenteroides* Isolated From Fruits.** *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(3), 1126-1138.
- Padmavathi, P., Sunitha, K., y Veeraiah, K. (2012). **Efficacy of probiotics in improving water quality and bacterial flora in fish ponds.** *African Journal of Microbiology Research*, 6(49), 7471-7478.
- Pan, W.-H., Li, P.-L., y Liu, Z. (2006). **The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians' faeces.** *Anaerobe*, 12(3), 148-152.
- Pang, H., Qiu, M., Zhao, J., Hoare, R., Monaghan, S. J., Song, D., Chang, Y., y Jian, J. (2018). **Construction of a *Vibrio alginolyticus* hopPmaJ (hop) mutant and evaluation of its potential as a live attenuated vaccine in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*).** *Fish & Shellfish Immunology*, 76, 93-100.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S., y 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(4), 379-388.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S., y Sugita, H. (2005). **The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Aquaculture*, 243(1-4), 241-254.

- Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., Puangkaew, J., y Aoki, T. (2007). **Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding.** *Developmental & Comparative Immunology*, 31(4), 372-382.
- Panigrahi, A., y Azad, I. S. (2007). **Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario.** *Fish Physiology and Biochemistry*, 33(4), 429-440.
- Parker, R. (1974). **Probiotics, the other half of the antibiotic story.** *Animal Nutrition and Health*, 29(4): 8.
- Peatman, E., y Liu, Z. (2007). **Evolution of CC chemokines in teleost fish: a case study in gene duplication and implications for immune diversity.** *Immunogenetics*, 59(8), 613-623.
- Penagos, G., Borato, P., e Iregui, C. (2009). **Sistema inmune y vacunación de peces.** *Acta Biológica de Colombia*, 14 (1), 3-24.
- Penders J., y Stobbering EE (2008). **Antibiotic resistance of motile aeromonads in indoor catfish and eel farms in the southern part of The Netherlands.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 31(3):261–265
- Pereiro, P., Figueras, A., y Novoa, B. (2019). **Insights into teleost interferon-gamma biology: An update.** *Fish & Shellfish Immunology*, 90, 150-164.
- Pérez, T., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., Halaihel, N., Vendrell, D., de Blas, I., y Múzquiz, J. L. (2010). **Host–microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem.** *Mucosal Immunology*, 3(4), 355-360.

- Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J. L., García, Y., Halaihel, N., Vendrell, D., De Blas, I., y Ruiz-Zarzuela, I. (2011a). **Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*.** *Journal of Fish Diseases*, 34(7), 499–507.
- Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J. L., Merrifield, D. L., Carnevali, O., Gioacchini, G., de Blas, I., y Ruiz-Zarzuela, I. (2011b). **Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection.** *Fish & Shellfish Immunology*, 31(2), 196-201.
- Pérez-Sánchez, T., Mora-Sánchez, B., y Balcázar, J. L. (2018). **Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges.** *Trends in Microbiology*, 26(11), 896-903.
- Picchiatti, S., Fausto, A. M., Randelli, E., Carnevali, O., Taddei, A. R., Buonocore, F., Scapigliati, G., y Abelli, L. (2009). **Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.).** *Fish & Shellfish Immunology*, 26(3), 368-376.
- Poynter, S. J., y DeWitte-Orr, S. J. (2016). **Fish interferon-stimulated genes: *The antiviral effectors*.** *Developmental and Comparative Immunology*, 65, 218-225.
- Pratt, C., y Campbell, M. D. (2019). **The effect of *bifidobacterium* on reducing symptomatic abdominal pain in patients with irritable bowel syndrome: A Systematic Review.** *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(3), 834-839.

Qi, Z., Zhang, X.-H., Boon, N., y Bossier, P. (2009). **Probiotics in aquaculture of China — Current state, problems and prospect.** *Aquaculture*, 290(1-2), 15-21.

Qin, H. L., Shen, T. Y., Gao, Z. G., Fan, X. B., Hang, X. M., Jiang, Y. Q., y Zhang, H. Z. (2005). **Effect of lactobacillus on the gut microflora and barrier function of the rats with abdominal infection.** *World journal of gastroenterology: WJG*, 11(17), 2591.

Qiu, X., y Davis, D. A. (2017). **Evaluation of flash dried yeast as a nutritional supplement in plant-based practical diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*.** *Aquaculture Nutrition*, 23(6), 1244-1253.

Queiroz, J. F., y Boyd, C. E. (1998). **Effects of a Bacterial Inoculum in Channel Catfish Ponds.** *Journal of the World Aquaculture Society*, 29(1), 67-73.

Raida, M. K., Larsen, J. L., Nielsen, M. E., y 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(8), 495-498.

Ramesha, T. J. (1999). **Effect of graded levels of G-probiotic on growth, survival and feed conversion of tilapia, *Oreochromis mossambicus*.** *Fishery Technology*, 36(1).

Rao, S. C., Athalye-Jape, G. K., Deshpande, G. C., Simmer, K. N., y Patole, S. K. (2016). **Probiotic supplementation and late-onset sepsis in preterm infants: A meta-analysis.** *Pediatrics*, 137(3), e20153684.

- Ravi, A. V., Musthafa, K. S., Jegathammbal, G., Kathiresan, K., y Pandian, S. K. (2007). **Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture.** *Letters in Applied Microbiology*, 45(2), 219-223.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. T., y McCormick, J. K. (2003). **Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice.** *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4), 658-672.
- Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramírez, D., Ascencio-Valle, F., Civera-Cerecedo, R., Gracia-López, V., y Barbosa-Solomieu, V. (2008). **Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress.** *Aquaculture*, 280(1-4), 39-44.
- Ringø, E. (2020). **Probiotics in shellfish aquaculture.** *Aquaculture and Fisheries*, 5(1), 1-27.
- Ringø, E., Dimitroglou, A., Hoseinifar, S. H., y Davies, S. J. (2014). **Prebiotics in Finfish: An Update.** *Aquaculture Nutrition*, 360-400.
- Ringø, E., Hoseinifar, S. H., Ghosh, K., Doan, H. V., Beck, B. R., y Song, S. K. (2018). **Lactic Acid Bacteria in Finfish—An Update.** *Frontiers in Microbiology*, 9, 1818.
- Ringø, E., Løvmo, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, I., Myklebust, R., Olsen, R. E., y Mayhew, T. M. (2010). **Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review.** *Aquaculture Research*, 41(4), 451-467.

- Ringø, E., y Song, S. K. (2015). **Application of dietary supplements (synbiotics and probiotics in combination with plant products and β -glucans) in aquaculture.** *Aquaculture Nutrition*, 22(1), 4-24.
- Ringo, E., y Vadstein, O. (1998). **Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae.** *Journal of Applied Microbiology*, 84(2), 227-233.
- Ringø, E., Zhou, Z., Vecino, J. L. G., Wadsworth, S., Romero, J., Krogdahl, Å., Olsen, R. E., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Owen, M., Lauzon, H. L., Martinsen, L. L., De Schryver, P., Bossier, P., Sperstad, S., y Merrifield, D. L. (2015). **Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story?** *Aquaculture Nutrition*, 22(2), 219-282.
- Robertson, P. A. W., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P., y Austin, B. (2000). **Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum).** *Aquaculture*, 185(3-4), 235-243.
- Román, L., Real, F., Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, B., Grasso, V., Bravo, J., y Acosta, F. (2012). **The in vitro effect of probiotic *Vagococcus fluvialis* on the innate immune parameters of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*.** *Fish & Shellfish Immunology*, 33(5), 1071-1075.
- Román, L., Acosta, F., Padilla, D., El Aamri, F., Bravo, J., Vega, B., Rodriguez, E., Vega, J., Déniz, S., y Real, F. (2015). **The in vitro immunomodulatory effect of extracellular products (ECPs) of *Vagococcus fluvialis* L21 on European sea**

bass (*Dicentrarchus labrax*) leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 42(2), 517-521.

Román, L., Real, F., Padilla, D., El Aamri, F., Déniz, S., Grasso, V., y Acosta, F. (2013).

Cytokine expression in head-kidney leucocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) after incubation with the probiotic *Vagococcus fluvialis* L-21. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(4), 1329-1332.

Romero, J., Feijoó, C. G., y Navarrete, P. (2012). **Antibiotics in aquaculture—use, abuse and alternatives.** *Health and Environment in Aquaculture*, 159.

Saad, TT y Atallah, ST (2014). **Estudios sobre infección bacteriana en peces marinos.** *Revista de la Sociedad Árabe de Acuicultura*, 374 (3354), 1-20.

Sakai, M. (1999). **Current research status of fish immunostimulants.** *Aquaculture*, 172(1-2), 63-92.

Salinas, I., Díaz-Rosales, P., Cuesta, A., Meseguer, J., Chabrilón, M., Moriñigo, M. Á., y Esteban, M. Á. (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(3-4), 279-286.

Salminen, S. J., Gueimonde, M., y Isolauri, E. (2005). **Probiotics That Modify Disease Risk.** *The Journal of Nutrition*, 135(5), 1294-1298.

Salminen, S., Isolauri, E., y Salminen, E. (1996). **Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges.** *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2-4), 347-358.

- Savan, R., y Sakai, M. (2006). **Genomics of fish cytokines.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 1(1), 89-101.
- Schaeck, M. (2016). **Probiotics in sea bass larviculture: development and application of an innovative toolbox to unravel their modes of action.** Doctoral Thesis, Ghent University. Faculty of Veterinary Medicine, Merelbeke, Belgium.
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., y Rice, C. M. (2014). **Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses.** *Annual Review of Immunology*, 32(1), 513-545.
- Schoenborn, J. R., y Wilson, C. B. (2007). **Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses.** *Advances in Immunology*, 41-101.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., y Hume, D. A. (2003). **Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions.** *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2), 163-189.
- Secombes, C. J. (2016). **What's new in fish cytokine research?.** *Fish & Shellfish Immunology*, 53, 1-3.
- Secombes, C. J., Wang, T., Hong, S., Peddie, S., Crampe, M., Laing, K. J., Cunningham, C., & Zou, J. (2001). **Cytokines and innate immunity of fish.** *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8-9), 713-723.
- Secombes, C. J., Wang, T., y Bird, S. (2011). **The interleukins of fish.** *Developmental and Comparative Immunology*, 35(12), 1336-1345.

- Secombes, C. J., Zou, J., y Bird, S. (2009). **Fish cytokines: discovery, activities and potential applications.** *Fish Defenses*, 1, 1-36.
- Seenivasan, C., Radhakrishnan, S., Muralisankar, T., y Bhavan, P. S. (2016). **Effects of probiotics on survival, growth and digestive enzymes activities in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879).** *Proceedings of the Zoological Society*. 69, (1), 52-60.
- Sepulcre, M. P., Sarropoulou, E., Kotoulas, G., Meseguer, J., y Mulero, V. (2007). ***Vibrio anguillarum* evades the immune response of the bony fish sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) through the inhibition of leukocyte respiratory burst and down-regulation of apoptotic caspases.** *Molecular Immunology*, 44(15), 3751-3757.
- Serrano P.H. (2005). **Responsible use of antibiotics in aquaculture.** *Food & Agriculture Organisation*, 469.
- Sharifuzzaman, S. M., Abbass, A., Tinsley, J. W., y Austin, B. (2011). **Subcellular components of probiotics *Kocuria* SM1 and *Rhodococcus* SM2 induce protective immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) against *Vibrio anguillarum*.** *Fish & Shellfish Immunology*, 30(1), 347-353.
- Sharifuzzaman, S. M., y Austin, B. (2009). **Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout.** *Fish & Shellfish Immunology*, 27(3), 440-445.

- Sharifuzzaman, S. M., y Austin, B. (2010). **Development of protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Vibrio anguillarum* following use of the probiotic *Kocuria SM1*.** *Fish & Shellfish Immunology*, 29(2), 212-216.
- Shen, W.-Y., Fu, L.-L., Li, W.-F., y Zhu, Y.-R. (2010). **Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth, performance, immune response and antioxidant activities of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*).** *Aquaculture Research*, 41(11), 1691-1698.
- Shukla, P., Verma, A. K., Dwivedi, P., Yadav, A., Gupta, P. K., Rath, S. K., y Mishra, P. R. (2014). **Moxifloxacin-Loaded Nanoemulsions Having Tocopheryl Succinate as the Integral Component Improves Pharmacokinetics and Enhances Survival in *E. coli*-Induced Complicated Intra-Abdominal Infection.** *Molecular Pharmaceutics*, 11(12), 4314-4326.
- Sica, M. G., Brugnoli, L. I., Marucci, P. L., y Cubitto, M.A. (2012). **Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming.** *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(4), 869–879.
- Snieszko, S. F., Bullock, G. L., Hollis, E., y Boone, J. G. (1964). ***Pasteurella* spp. from an epizootic of white perch (*roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas.** *journal of bacteriology*, 88(6), 1814-1815.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L. G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottiere, H. M., Dore, J., Marteau, P., Seksik, P., y Langella, P. (2008). ***Faecalibacterium prausnitzii* is an**

- anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16731-16736.
- Solbakken, M. H., Rise, M. L., Jakobsen, K. S., y Jentoft, S. (2016). **Successive Losses of Central Immune Genes Characterize the Gadiformes' Alternate Immunity.** *Genome Biology and Evolution*, 8(11), 3508-3515.
- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., y Frost, P. (2005). **Vaccines for fish in aquaculture.** *Expert Review of Vaccines*, 4(1), 89-101.
- Son, V. M., Chang, C.-C., Wu, M.-C., Guu, Y.-K., Chiu, C.-H., y 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(5), 691-698.
- Song, M., Yun, B., Moon, J.-H., Park, D.-J., Lim, K., y Oh, S. (2015). **Characterization of Selected *Lactobacillus* Strains for Use as Probiotics.** *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(4), 551-556.
- Song, S. K., Beck, B. R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H. D., y Ringø, E. (2014). **Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review.** *Fish & Shellfish Immunology*, 40(1), 40-48.
- Sorroza, L. (2012). **Propuesta de nuevas cepas probióticas para uso en acuicultura** (Tesis doctoral). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria.

Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, F., Román, L., Grasso, V., Vega, J., y Real, F. (2012).

Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. *Veterinary Microbiology*, 155(2-4), 369-373.

Sorroza, L., Real, F., Acosta, F., Acosta, B., Déniz, S., Román, L., Aamri, F. E., y Padilla,

D. (2013). **A Probiotic Potential of *Enterococcus gallinarum* against *Vibrio anguillarum* Infection.** *Fish Pathology*, 48(1), 9-12.

Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Sick, E. B., Pipper, C. B., Martinussen, T.,

Slierendrecht, W. J., y Gram, L. (2001). **The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout.** *Environmental Microbiology*, 3(12), 755-765.

Spinos, E., Kokkoris, G. D., y Bakopoulos, V. (2017). **Prevention of sea bass**

(*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) photobacteriosis and vibriosis. Long term efficacy study of intraperitoneally administered bivalent commercial vaccines. *Aquaculture*, 471, 172-184.

Spreng, S., Dietrich, G., y Weidinger, G. (2006). **Rational design of *Salmonella*-based**

vaccination strategies. *Methods*, 38(2), 133-143.

Srisapoome, P., y Areechon, N. (2017). **Efficacy of viable *Bacillus pumilus* isolated**

from farmed fish on immune responses and increased disease resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Laboratory and on-farm trials. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 199-210.

- Standen, B. T., Rawling, M. D., Davies, S. J., Castex, M., Foey, A., Gioacchini, G., Carnevali, O., y Merrifield, D. L. (2013). **Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal and peripheral immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(4), 1097-1104.
- Subramanian, S., MacKinnon, S. L., y Ross, N. W. (2007). **A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 148(3), 256-263.
- Sugita, H., Miyajima, C., y Deguchi, Y. (1991). **The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish**. *Aquaculture*, 92, 267-276.
- Sun, J., Marwah, G., Westgarth, M., Buys, N., Ellwood, D., y Gray, P. H. (2017). **Effects of probiotics on necrotizing enterocolitis, sepsis, intraventricular hemorrhage, mortality, length of hospital stay, and weight gain in very preterm infants: A meta-analysis**. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 8(5), 749-763.
- Sun, Y.-Z., Yang, H.-L., Ma, R.-L., y Lin, W.-Y. (2010). **Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides***. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(5), 803-809.
- Suzer, C., Çoban, D., Kamaci, H. O., Saka, Ş., Firat, K. ş., Otgucuoğlu, Ö., y Küçükşari, H. (2008). ***Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities**. *Aquaculture*, 280(1-4), 140-145.

Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., y Yamamoto, S. (2001). **Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amyolyticum* sp. nov.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(5), 1639-1652.

Suzuki, S., Pruden, A., Virta, M., y Zhang, T. (2017). **Antibiotic Resistance in Aquatic Systems.** *Frontiers in Microbiology*, 8, 14.

Takeda, K., Suzuki, T., Shimada, S.-I., Shida, K., Nanno, M., y Okumura, K. (2006). **Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota.** *Clinical and Experimental Immunology*, 146(1), 109-115.

Takeda, K., y Okumura, K. (2007). **Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the human NK-Cell Activity.** *The Journal of Nutrition*, 137(3), 791S-793S.

Tapia-Paniagua, S. T., Vidal, S., Lobo, C., Prieto-Álamo, M. J., Jurado, J., Cordero, H., Cerezuela, R., García de la Banda, I., Esteban, M. A., Balebona, M. C., y Moriñigo, M. A. (2014). **The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease.** *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 209-221.

- Tena, D., Fernández, C., y Lago, M. R. (2015). ***Alcaligenes faecalis*: an Unusual Cause of Skin and Soft Tissue Infection.** *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 68(2), 128-130.
- Thankappan, B., Ramesh, D., Ramkumar, S., Natarajaseenivasan, K., y Anbarasu, K. (2014). **Characterization of *Bacillus* spp. From the Gastrointestinal Tract of *Labeo rohita*—Towards to Identify Novel Probiotics Against Fish Pathogens.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(1), 340-353.
- Tinh, N. T. N., Dierckens, K., Sorgeloos, P., y Bossier, P. (2008). **A Review of the Functionality of Probiotics in the Larviculture Food Chain.** *Marine Biotechnology*, 10(1), 1-12.
- Tizard IR.(1995) **Veterinary Immunology: an introduction.** 4th ed. London: Saunders College.
- Toranzo, A. E., Magariños, B., y Romalde, J. L. (2005). **A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems.** *Aquaculture*, 246(1-4), 37-61.
- Toranzo, A. E., y Barja, J. L. (1993). **Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish.** *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 5-36.
- Tovar, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F. J., Vázquez-Juárez, R., y Lésel, R. (2002). **Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae.** *Aquaculture*, 204(1-2), 113-123.
- Tovar-Ramírez, D., Mazurais, D., Gatesoupe, J. F., Quazuguel, P., Cahu, C. L., y Zambonino-Infante, J. L. (2010). **Dietary probiotic live yeast modulates**

antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 300(1-4), 142-147.

Tracey, K. J., y Cerami, A. (1993). **Tumor necrosis factor, other cytokines and disease.** *Annual review of cell biology*, 9(1), 317-343.

Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R. y Moran, G. (2011). **Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review.** *Veterinarni Medicina*, 56 (10): 486–503.

Uzunkoy, A., Ozardali, I., Celik, H., y Demirci, M. (2012). **The effect of carbondioxide pneumoperitoneum on the severity peritonitis.** *Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 18(2), 99-104.

Vadstein, O., Bergh, Ø., Gatesoupe, F.-J., Galindo-Villegas, J., Mulero, V., Picchietti, S., Scapigliati, G., Makridis, P., Olsen, Y., Dierckens, K., Defoirdt, T., Boon, N., De Schryver, P., y Bossier, P. (2013). **Microbiology and immunology of fish larvae.** *Reviews in Aquaculture*, 5, S1-S25.

Van der Poll, T., Marchant, A., Buurman, W. A., Berman, L., Keogh, C. V., Lazarus, D. D., Nguyen, L., Goldman, M., Moldawer, L. L., y Lowry, S. F. (1995). **Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis.** *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(11), 5397–5401.

Van Doan, H., Hoseinifar, S. H., Khanongnuch, C., Kanpiengjai, A., Unban, K., Van Kim, V., y Srichaiyo, S. (2018). **Host-associated probiotics boosted mucosal and serum immunity, disease resistance and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Aquaculture*, 491, 94-100.

- Varela, J. L., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Arijo, S., León-Rubio, J. M., García-Millán, I., Martín del Río, M. P., Moriñigo, M. A., y Mancera, J. M. (2010). **Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream (*Sparus aurata*).** *Aquaculture*, 309(1-4), 265-271.
- Vásquez - Piñeros, M. A., Rondón - Barragan, I. S., y Eslava- Mocha, P. R. (2012). **Inmunoestimulantes en teleósteos: Probióticos, β -glucanos y LPS.** *Orinoquia*, 16(1), 46.
- Vendrell, D., Luis Balcázar, J., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Gironés, O., y Luis Múzquiz, J. (2008). **Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria.** *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31(4), 337-345.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., y Verstraete, W. (2000). **Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655-671.
- Vijayabaskar, P., y Somasundaram, S. T. (2008). **Isolation of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria from Fish Gut and Probiotic Activity Against Common Fresh Water Fish Pathogen *Aeromonas hydrophila*.** *Biotechnology (Faisalabad)*, 7(1), 124-128.
- Vine, N. G., Leukes, W. D., y Kaiser, H. (2006). **Probiotics in marine larviculture.** *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), 404-427.

Wang, R., Feng, J., Su, Y., Ye, L., y Wang, J. (2013). **Studies on the isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased golden pompano (*Trachinotus ovatus* Linnaeus) and antibacterial agents sensitivity.** *Veterinary Microbiology*, 162(2-4), 957-963.

Wang, Y.-B., Li, J.-R., y Lin, J. (2008). **Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook.** *Aquaculture*, 281(1-4), 1-4.

Wei, X., Li, B., Wu, L., Yin, X., Zhong, X., Li, Y., Wang, Y., Guo, Z., y Ye, J. (2018). **Interleukin-6 gets involved in response to bacterial infection and promotes antibody production in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Developmental & Comparative Immunology*, 89, 141-151.

Wheeler, A. P., y Bernard, G. R. (1999). **Treating patients with severe sepsis.** *New England Journal of Medicine*, 340(3), 207-214.

Wong, S., y Rawls, J. F. (2012). **Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host ecology and environment.** *Molecular Ecology*, 21(13), 3100-3102.

Wu, X. Z., Wen, Z. G., y Hua, J. L. (2019). **Effects of dietary inclusion of *Lactobacillus* and inulin on growth performance, gut microbiota, nutrient utilization, and immune parameters in broilers.** *Poultry Science*, 98(10), 4656-4663.

Xiao, Z., Liu, L., Tao, W., Pei, X., Wang, G., y Wang, M. (2018). ***Clostridium Tyrobutyricum* Protect Intestinal Barrier Function from LPS-Induced**

Apoptosis via P38/JNK Signaling Pathway in IPEC-J2 Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(5), 1779-1792.

Yano, Y., Hamano, K., Satomi, M., Tsutsui, I., Ban, M., y Aue-umneoy, D. (2014).

Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand. *Food Control*, 38, 30-36.

Yi, Y., Zhang, Z., Zhao, F., Liu, H., Yu, L., Zha, J., y Wang, G. (2018). **Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW: Antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus*.** *Fish & Shellfish Immunology*, 78, 322-330.

Zhang, L., Xu, D., Wang, F., y Zhang, Q. (2019). **Antifungal activity of *Burkholderia* sp. HD05 against *Saprolegnia* sp. by 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid.** *Aquaculture*, 511, 634-198.

Zhang, X., Li, Y.-W., Mo, Z.-Q., Luo, X.-C., Sun, H.-Y., Liu, P., Li, A.-X., Zhou, S.-M., y Dan, X.-M. (2014). **Outbreak of a novel disease associated with *Vibrio mimicus* infection in fresh water cultured yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*.** *Aquaculture*, 432, 119-124.

Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y., y Li, W. (2010a). **Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response.** *Fish physiology and biochemistry*, 36(3), 501-509.

- Zhou, X., Wang, Y., Yao, J., y Li, W. (2010b). **Inhibition ability of probiotic, Lactococcus lactis, against A. hydrophila and study of its immunostimulatory effect in tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. *International Journal of Engineering, Science and Technology*, 2(7).
- Zokaeifar, H., Balcázar, J. L., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K., Arshad, A., y Nejat, N. (2012a). **Effects of Bacillus subtilis on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, Litopenaeus vannamei**. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4), 683-689.
- Zokaeifar, H., Luis Balcázar, J., Kamarudin, M. S., Sijam, K., Arshad, A., y Saad, C. R. (2012b). **Selection and identification of non-pathogenic bacteria isolated from fermented pickles with antagonistic properties against two shrimp pathogens**. *The Journal of Antibiotics*, 65(6), 289-294.
- Zorriehzahra, M. J., Delshad, S. T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., y Lazado, C. C. (2016). **Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review**. *Veterinary Quarterly*, 36(4), 228-241.
- Zou, J., y Secombes, C. (2016). **The Function of Fish Cytokines**. *Biology*, 5(2), 23.

A decorative graphic at the top of the page featuring a blue, textured splash or wave effect that tapers off towards the right. The splash has a grainy, water-like appearance with varying shades of blue and white.

AGRADECIMIENTOS

XI.- AGRADECIMIENTOS

Sin duda, esta es la parte del manuscrito de la que nunca me cansaré de escribir porque, a pesar de que no hayan sido muchísimas las personas que me han acompañado en esta etapa de mi vida, los agradecimientos hacia ustedes siempre serán infinitos. Quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han contribuido a la realización de mi Tesis Doctoral, así como a todas aquellas que simplemente se han cruzado en mi camino durante estos años.

En primer lugar, me gustaría expresar mi gratitud a mis directores de Tesis, al Dr. Fernando Real, por darme esta gran oportunidad, por la confianza depositada en mi y por la amabilidad con la que me ha tratado siempre.

Y a Daniel Padilla, a quien es inevitable hacer una mención especial, por tu implicación, tu paciencia y por esa manía de quitarle importancia a las cosas que no la tienen. Gracias también por la cercanía que transmites y la confianza que hemos forjado, más allá del ámbito profesional, permitiéndome ser yo misma en todo momento. Sin tu ayuda esto no hubiera sido posible.

Igualmente, quisiera agradecer a la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) por haberme proporcionado financiación durante estos cuatro años y por las ayudas concedidas para mi investigación.

Y ahora, toca el turno de agradecer a mis compañeros, y también amigos del IUSA (Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria):

A Andrés, quien se cruzó en mi camino hace ya casi 11 años, pero ha sido en esta última etapa cuando he tenido la gran suerte de conocerle. Gracias por acompañarme en el laboratorio y aprender juntos a base de errores. Y, aunque no lo creas, en estos años te he visto “crecer” y madurar muchísimo, cosa que me enorgullece enormemente.

A nuestra técnico de laboratorio, Manuela Martel “Manola”, de ti ya sabes que podría escribir un libro... gracias por enseñarme a trabajar en el laboratorio, por los consejos dentro y fuera del mismo, por tu alegría y tus ocurrencias...por estar siempre

dispuesta a ayudar y por las mil y una anécdotas que hemos vivido y nos quedarán en la memoria (o por lo menos a mi), muchísimas gracias.

A mi querida María, quien se preocupa por todo más que incluso yo misma, gracias por tu amistad, porque me eches de menos cuando no estoy y me lo hagas saber, y sobre todo, por dejar siempre la puerta abierta donde quiera que estés para poder incordiarte.

A Juanjo, aunque considero que ha sido muy escaso el tiempo que he podido disfrutar de ti, sin duda eres una persona maravillosa que siempre tiene respuesta y solución para todo.

A Natalia, por la paz que transmites, por tu positividad en el laboratorio y por ser el claro ejemplo del trabajo bien hecho.

A Freddy, la persona que le pone un punto de locura al edificio, por tu ingenio, tus bromas, y por ambientarnos el edificio en cada época del año y hacerlo mucho más bonito.

Al grupo de Enfermedades Parasitarias del IUSA, a Jorge, Julia y especialmente a Tara y Cinthia, por tener siempre una sonrisa en la cara, por el apoyo logístico con los trámites del doctorado y por unirse a todas las fiestas sin pensarlo.

A mi querida Ruth, “mi mamá del IUSA”, por brindarme tanto amor y hacerme sentir querida, por tus frases de aliento, y por tu forma de ser tan peculiar. También por tus consejos, tu bondad y por consentirme tanto.

A muchos de mis profesores de carrera, que he tenido la suerte de seguir viendo y compartiendo momentos éstos últimos años: Bismark, Ana Sofía, Soraya, Begoña, Inma y Anselmo.

A nuestros administrativos, por estar siempre al pie del cañón y dispuestos a ayudar en todo, Jose Ángel y Mercedes.

No puedo dejar de agradecer a José Luis Martín Barrasa, que me permitió trabajar en su laboratorio en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria, Dr. Negrín, para que parte de este trabajo se pudiera llevar a cabo. Y no sólo eso,

sino también por su simpatía, buen humor y magnífico trato siempre. Al resto del equipo y a las técnicas de laboratorio que allí conocí y que me tendieron una mano cuando fue necesario. Y a Laura, por acompañarme y compartir el sufrimiento en la andadura de las qPCR.

A todos los chicos que han pasado en algún momento por el laboratorio de enfermedades Infecciosas: Betania, María Santana, Nacho... por las risas y buenos momentos, porque malos nunca existieron.

A los compañeros del desayuno, por los buenos ratos y las conversaciones surrealistas en la cafetería de la facultad.

A todas las personas maravillosas que conocí en mi estancia en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza: Tania Pérez, José Luis Múzquiz, a los doctorandos que allí se formaban y especialmente a Mario, persona fundamental que me acompañó en todas y cada una de mis locuras, que no fueron pocas.

Gracias también a Miguel Rivero, por ayudarme con los trámites del doctorado, y a Raquel y Marina por resolverme cualquier cuestión referente al doctorado. En general, a todo el equipo del IUSA “de arriba”, sin duda deben estar muy orgullosos del gran equipo que han formado.

Gracias a todos compañeros, por su ayuda, su apoyo, por los tantísimos momentos buenos que hemos compartido, por las mil y una celebraciones, por las conversaciones y confesiones que hemos compartido en la cocina del edificio. De todo corazón le estaré eternamente agradecida, y siempre les llevaré en mi recuerdo.

También me gustaría agradecer a todas las personas externas que me han apoyado en este camino, aunque no tuvieran ni idea de lo que esto se trataba. A mis amigos “los de siempre” por el apoyo moral, por preguntarme cómo estaba y cómo iba con la tesis: Ceci, Davi, Jenni... A los que estuvieron y que por determinadas circunstancias ya no están, gracias también y particularmente, a quien se incorpora recientemente a mi vida para hacerla más bonita.

Por supuesto, GRACIAS a mi familia, en especial a mis padres, por su apoyo incondicional, por vuestro interés en mi desarrollo personal y académico y el sacrificio

| AGRADECIMIENTOS

que ello ha conllevado. A mi ángel de la guarda... que estarías tan orgulloso como siempre de tu “princesa”.

Y, por último, pero no menos importante, a mi familia de cuatro patas, que me ha acompañado todo este tiempo y ha sido partícipe de mis momentos más felices, a mi viejita Maggie, y a Dama, mi compañera leal y mi salvación, por darme a cada instante tu amor incondicional.

A decorative graphic at the top of the page featuring a blue, textured splash or wave pattern that tapers off towards the right. The word "PUBLICACIONES" is centered within this graphic.

PUBLICACIONES



Characterization *in vitro* of new bacterial strains showing potentially probiotic crossed effect against vibriosis in relevant fish species for marine aquaculture

Ana Gutiérrez-Falcón , Daniel Padilla , María José Ramos Sosa , José Luis Martín Barrasa , Begoña Acosta-Hernández , Andrés Sánchez Henao , Natalia García Álvarez , Inmaculada Rosario Medina , Soraya Déniz & Fernando Real

To cite this article: Ana Gutiérrez-Falcón , Daniel Padilla , María José Ramos Sosa , José Luis Martín Barrasa , Begoña Acosta-Hernández , Andrés Sánchez Henao , Natalia García Álvarez , Inmaculada Rosario Medina , Soraya Déniz & Fernando Real (2020) Characterization *in vitro* of new bacterial strains showing potentially probiotic crossed effect against vibriosis in relevant fish species for marine aquaculture, Journal of Applied Animal Research, 48:1, 553-558, DOI: [10.1080/09712119.2020.1844714](https://doi.org/10.1080/09712119.2020.1844714)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/09712119.2020.1844714>



© 2020 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



Published online: 21 Nov 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 138



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Characterization *in vitro* of new bacterial strains showing potentially probiotic crossed effect against vibriosis in relevant fish species for marine aquaculture

Ana Gutiérrez-Falcón, Daniel Padilla , María José Ramos Sosa, José Luis Martín Barrasa , Begoña Acosta-Hernández , Andrés Sánchez Henao, Natalia García Álvarez , Inmaculada Rosario Medina , Soraya Déniz  and Fernando Real 

Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Arucas, Spain

ABSTRACT

Intensive fish farms are often affected by different organisms that produce infectious diseases. To control this situation, antibiotics have been used with negative repercussions for the environment and health. As an alternative to this, probiotics are used that show more effective and respectful results with the environment. The aim of this project is to obtain new potentially probiotic strains against one of the most relevant pathogens of marine aquaculture, vibrios. These bacterial strains were isolated from the gills and intestines of European seabass, meagre and common sole. Later, were evaluated *in vitro* against 6 pathogenic strains of the genus *Vibrio* to demonstrate the production of antagonistic effects, production of antibacterial substances, resistance to bile, resistance to pH gradients, adhesion and growth to mucus, competition for nutrients and hydrophobicity. A total of 156 bacterial strains were isolated, but only 7 strains of the genera *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Shewanella* and *Proteus*, showed excellent *in vitro* results to be considered as candidates to be reevaluated by *in vivo* tests, to determine their harmlessness and protective effect after challenge, and elucidating in future studies their use as possible probiotic strains for aquaculture, highlighting the results obtained with the strain *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1.

ARTICLE HISTORY

Received 27 January 2020
Accepted 16 October 2020

KEYWORDS

Marine aquaculture;
probiotics; vibrio; crossed
effect

Introduction

Aquaculture has been considered as the fastest growing food production system in the world, however, it has been affected by the onset of infectious diseases, that suppose a limitation to the expansion of this sector because many of these pathogens are part of the normal flora of the water (Pillay 2004; Austin and Austin 2012; Sharifuzzaman and Austin 2017). The importance of aquaculture products will increase as a result of illegal and overfishing in the world and the increasing demand for seafood with the ever-increasing population (Kesarcodei-Watson et al. 2008). In southern Europe, the culture of European seabass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) and common sole (*Solea solea*) are of high importance.

Growth of aquaculture industry is hampered by unpredictable mortality, many of them caused by pathogenic microorganisms, with a less importance of non-infectious diseases (Ibrahem 2015). Bacterial diseases are very common in intensive aquaculture producing a huge economic loss (Sica et al. 2012). However, a major drawback in aquaculture is the sudden outbreak of diseases, especially those caused by different species of genus *Vibrio*, which are considered as major pathogenic bacteria in aquaculture (Bergh et al. 2001). The disease caused by pathogenic species of the Genus *Vibrio* affects different species of farmed marine fish of commercial

interest throughout the world and is widely responsible for mortality in cultured aquaculture systems (Chen et al. 2000).

Antibiotics are the first option to farmers to control infectious diseases, due to rapid action and availability. However, despite of being an effective strategy in the beginning, the negative effects on environmental and public health justifying the need of developing new strategies (Hagi and Hoshino 2009). In order for the aquaculture sector to expand, it is necessary to find alternatives to antibiotics, safe and effective (Abdelkhalek et al. 2017; Yan et al. 2017). Due to this reason, the European Union placed restrictions on antibiotic use in aquaculture and to solve this problem, research has been focused on alternative environmentally friendly methods to control disease (Sorroza et al. 2012).

The use of probiotics is gaining interest in the aquaculture industry as an environmentally friendly management alternative to the use of antibiotics and other antimicrobials for disease prevention and reduce the incidence of fish diseases (Etyemez and Balcázar 2016). Most probiotics used in aquaculture are lactic acid bacteria or bacterial strains that belong to the genus *Vibrio*, *Bacillus* and *Pseudomonas* (Balcázar et al. 2007). These have been tested in food or added to water, and the most studied aspect has been on the improvement in animal health (Gatesoupe 1999). Today, there are many commercial probiotics available for mono or multi-strain

CONTACT Daniel Padilla  daniel.padilla@ulpgc.es  Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Arucas, 35413, Spain

© 2020 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

bacteria (Van Doan et al. 2017). When selecting a new microorganism for testing as an effective probiotic, a number of properties need to be considered. To colonize the gastrointestinal tract, potential probiotics should express high tolerance to acid and bile, have the ability to adhere to intestinal surfaces and, immune modulation (Hagi and Hoshino 2009; Sica et al. 2012). Among them, potential probiotics should provide protection through the creation of a hostile environment for pathogens by the production of inhibitory compounds and by competing for adhesion sites (Etyemez and Balcázar 2016). To date, a wide range of bacteria proposed for their application as probiotics (Kesarcodi-Watson et al. 2008). However, this area is not so explored and a few probiotics are commercially available to market (Banerjee and Ray 2017). The use of probiotics is regarded as a very promising strategy and their wide acceptance for use in aquaculture is evidently shown in the number of research studies published over the last 10 years (Lazado and Caipang 2014). The aim of the present work has been to carry out the *in vitro* evaluation of bacterial strains isolated from the gut and gills of seabass, meagre and common sole, looking for those showing wider activity against different pathogen species of the genus *Vibrio* in marine aquaculture.

Materials and methods

Ethics statement

The experimental procedure with fish collected in this study fulfils the requirements contained in the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of September 22, 2010, on the protection of animals used for scientific purposes.

Sampling and isolation of potential probiotic strains

A total of 12 European seabass (*Dicentrarchus labrax*), 19 meagre (*Argyrosomus regius*) and 12 common sole (*Solea solea*) were slaughtered by immersion in anaesthetic solution with clove oil and sacrificed in liquid ice and kept in refrigeration conditions. The intestinal content of each fish (one-gram amounts) was homogenized in phosphate buffered saline (PBS), and serial dilutions (1/10–1/1000) were spread on Brain Heart Infusion Agar (BHIA), Marine Agar (MA) and Blood Agar (BA) for 48 h at 25°C. In addition, gill samples were taken directly by means of a sowing handle and spread in the same culture media. All isolates strains were tested for antagonistic effects as potential probiotic strains.

Table 1. Pathogenic strains used in testing antagonistic effect.

Pathogen strains	Reference
<i>Vibrio anguillarum</i> 112P	CECT
<i>Vibrio anguillarum</i> 975-1	CECT
<i>Vibrio anguillarum</i> 507	CECT
<i>Vibrio anguillarum</i> 4347	CECT
<i>Vibrio harveyi</i> 525	CECT
<i>Vibrio alginolyticus</i> 521	CECT

Note: CECT: Spanish type culture collection.

Antagonistic effect of potential probiotic strains against *Vibrio*

The production of antagonistic effect was analysed using different species and strains of the genus *Vibrio* (Table 1) following the method described previously by Austin et al. (1992). *Vibrio* strains and potential probiotic strains were grown in Brain Heart Infusion Broth (BHIB) for 24 h at 25°C to obtain an exponential phase culture. Then, 100 µl of different pathogen strains (10⁷ CFU/ml) were spread on BHIA and BA, and each isolated strain of the fish was put into the plate. Inoculated plates were incubated at 25°C for a maximum of 48 h until a halo of inhibition is observed. Strains with positive halo production were identified by MALDI-TOF mass spectrometry system (Autoflex III, Bruker Daltonics GmbH) (Croxatto et al. 2012; Bizzini and Greub 2010).

Production of antibacterial substances of probiotics against pathogens

In order to determine the production of antibacterial substances in bacterial supernatants we followed the well diffusion method described by Nikoskelainen et al. (2001) with modifications (Kim and Austin 2008). Potential probiotic strains were cultured in BHIB 24 h at 22°C, centrifuged at 2000 g (Sigma, 4-16KS) for 10 min and the supernatants sterilized through 0.45 µm-pore-size filters and lyophilized using a freeze dryer (Telstar, Cryodos-50) for 18 h. The freeze-dried supernatant was re-suspended in 100 µl of PBS (10 times concentrated) to be challenged against pathogens. *Vibrio* strains were grown in BHIB overnight and transferred evenly onto TSA and BA plates. Then, 10 µl of lyophilized sample was added to each well, made with sterile Pasteur pipette, and the inhibition zone was observed after incubation for 24 h.

Fish bile and pH resistance

Fish bile was obtained from sea bass (average 400 g body weight) with a previous 24 h fast. Once sacrificed with oil of clove and immersion in liquid ice, we proceed to the extraction of the biliary secretion by direct puncture under sterile conditions with a fine needle. To analyse the resistance to fish bile, a 100 µl aliquot of fresh bile of seabass was added to 900 µl of each potential probiotic strain analysed at 10⁷ CFU/ml. In order to determine the resistance at acid pH, 100 µl of same concentrations of strains tested was added 100 ml of PBS with a pH range 3–7. In both test, samples were incubated for 90 min at 22°C and serially diluted in PBS and determined by plate counting on TSA (Nikoskelainen et al. 2001).

Surface characteristics: hydrophobicity

The hydrophobicity is used as an indicator of the ability of the bacteria to adhere to tissues, and was analysed by the microbial adhesion to hydrocarbons method (Ocaña et al. 1999). 600 µl of xylene (Panreac) is added to 2.4 ml of bacterial suspension with absorbance from 0.4 to 0.6 (OD₆₀₀) and vortexed vigorously for 90 s. They were kept still to allow the immiscible solvent and

aqueous phase to separate for 30 min. The aqueous layer was carefully removed, transferred to clean tubes and measured the absorbance by spectrophotometry (Selecta, V-1100). The percent of hydrophobicity (H%) was obtained from the following formula:

$$H = \left[\frac{\text{Initial OD} - \text{Final OD}}{\text{Initial OD}} \right] \times 100$$

The cellular hydrophobicity is classified as high (71–100%), medium (36–70%) and low (0–35%).

Adhesion in intestinal and skin mucus

Intestinal and skin mucus was isolated from healthy sea bass of 400 g of average body weight. All mucus was centrifuged twice at 12,000 g for 5 min to remove particulate and cellular material, and adjusted to 0.5 mg/ml protein in PBS by Bradford Protein assay. The percentage of adhesion to intestinal and skin mucus was evaluated following the methodology described by Eyemez and Balcázar (2016). Briefly, 100 µl of each mucus was deposited in polystyrene plates overnight at 4°C. The wells were washed twice with sterile PBS and 100 µl of a bacterial suspension of each potentially probiotic strain is added at a concentration of 10⁹ CFU/ml in PBS and then incubated for 1 h at 22°C. The plates were washed to release the bacteria that remained attached to the polystyrene plate, 0.5% Triton X-100 was added to each well for 5 min. Adhesion was expressed as the percentage of bacteria recovered after adhesion in relation to the number of bacteria initially added to each well.

Growth in intestinal and skin mucus

The intestinal and skin mucus isolated from sea bass was diluted in sterile PBS to a final protein concentration of 0.5 mg/ml. Then, 3 ml of diluted mucus was added to 10 ml of an overnight culture of each potentially probiotic strain, and incubated at 22°C for 22 h in a shaking incubator. Samples with BHIB and PBS were used as negative controls. The growth rate of each strain in intestinal and skin mucus, BHIB and PBS was measured by monitoring the optical

density at 540 nm and serial dilutions on TSA (Olsson et al. 1992).

Inhibition of growth in co-culture

Potential probiotics and *Vibrio* strains were cultured overnight in trypticasein soybean medium (TSB), centrifuged at 2000 g for 10 min, performing two washes with sterile PBS. Bacterial suspension was adjusted by spectrophotometry at 0.5 absorbance at 600 nm. Then, 100 µl of each bacterial suspension (probiotic and pathogen), were mixed in 1ml of TSB medium and incubated at 22°C for 48 h, and serially diluted in PBS and determined by plate counting on TSA (Nikoskelainen et al. 2001).

Statistical analysis

All experiments were carried out in triplicated using the univariate general model. Data were analysed by two-way analysis of variance (ANOVA) using the statistical package SPSS for Windows version 22.0 (SPSS). Differences were considered statistically significant when *p* < 0.05.

Results

A total of 156 bacterial strains were recovered from the intestinal gut and gills of the different species of fish sampled, but only 7 strains showed inhibitory effect against at least, one of the pathogens tested of the genus *Vibrio*. Table 2 shows the identification of these potential probiotic strains by the MALDI-TOF mass spectrometry system, as well as their profiles of growth inhibition against the vibrio strains analysed. Of the 7 strains that have presented inhibition of growth against pathogens used, the strain *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 is the only one that has an inhibitory effect against all the vibrio strains tested. Conversely, the strains *Proteus penneri*-1 and *Proteus penneri*-2 only have an inhibitory effect against a single strain, *Vibrio anguillarum* 4347.

Table 2. *In vitro* antagonistic effect and identification of potential probiotic strains isolated from in seabass, meagre and common sole against *Vibrio*.

Pathogen strains tested	Potential probiotic strains (No.)						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Vibrio anguillarum</i> 112P	+	+	+				
<i>Vibrio anguillarum</i> 975-1	+			+	+		
<i>Vibrio anguillarum</i> 507	+	+	+				
<i>Vibrio harveyi</i> 525	+	+	+				
<i>Vibrio alginolyticus</i> 521	+				+		
<i>Vibrio anguillarum</i> 4347	+			+	+	+	+

Notes: Source of pathogens strains tested is showed in Table 1.

1. – *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1
2. – *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-2
3. – *Pseudomonas viridiflava*
4. – *Shewanella putrefaciens*
5. – *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-3
6. – *Proteus penneri*-1
7. – *Proteus penneri*-2

+ potential probiotic strain isolated shows antagonistic effect against any pathogen strains tested.

Table 3. Percentage of survival to pH gradients tested for potential probiotic strains isolated from seabass, meagre and common sole.

pH	Probiotic strains tested (No.) % survival†† (mean ± sd)						
	1	2	3	4	5	6	7
pH 7	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
pH 6	91.6 ± 3.3	71.8* ± 2.2	85.7 ± 3.5	81.4 ± 2.5	81.3 ± 8.0	89.5 ± 3.3	74.1* ± 4.4
pH 5	74.3* ± 4.5	41.5* ± 3.5	65.5* ± 1.2	65.4* ± 3.4	62.5* ± 3.2	72.7* ± 2.0	69.6* ± 2.9
pH 4	50.4* ± 10.6	25.2* ± 2.7	55.6* ± 0.8	35.5* ± 2.5	43.6* ± 2.6	66.5* ± 3.5	43.0* ± 2.0
pH 3	6.3* ± 3.8	4.9* ± 1.84	11.5* ± 0.9	11.1* ± 1.3	2.9* ± 0.2	63.5* ± 3.0	18.8* ± 1.8

Notes: 1. – *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1

2. – *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-2

3. – *Pseudomonas viridiflava*

4. – *Shewanella putrefaciens*

5. – *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-3

6. – *Proteus penneri*-1

7. – *Proteus penneri*-2

††percentage of survival for each pH value was carried out in triplicated.

*statistically significant differences were found for the percentage of survival of a pH value with regard to that showed for the same strain at pH 7 (*P* < 0.05).

Only the strain *Shewanella putrefaciens* produced a zone of inhibition around the well on BHIA by well diffusion method against the tested pathogens where it showed an antagonistic effect, showing that the inhibitory effect was due to the production of antimicrobial substances in its metabolism.

As the pH decreases, the bacterial viability is reduced (Table 3), showing values below 50% at pH 3, except for the strain *Proteus penneri*-1 that shows a viability of 63.5%. The viability of strains *Proteus penneri*-1 and *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 are not affected significantly ($P < 0.05$) by the action of bile, showing survival rates of 99.2% and 95.7%, respectively. The other probiotics tested are affected significantly by the action of the bile, showing values below 50%.

A total of 4/7 probiotic strains have hydrophobic capacity. The strains *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas viridiflava* shows high hydrophobicity, with values of 86% and 79%, respectively. The strains *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 and *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-2 shows medium hydrophobicity (38% and 68%). The other potential probiotic strains tested show hydrophilic capacity.

All strains tested have the ability to use sea bass intestinal and skin mucus as a source of nutrients, producing a statistically significant growth after 24 h of incubation with increments greater than 1 logarithm, highlighting the *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 and *Proteus penneri*-1. In the adhesion test, the strain *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-3 shows the highest adhesion in the intestinal mucus (16.8%) and in the skin mucus (26.08%). The rest of the strains have an average adherence under 10%.

All potential probiotic strains tested produced a decrease in the growth of vibrio strains analysed in the test of inhibition of growth in co-culture after 24 h of incubation, but this decrease was only statistically significant for the probiotic *Proteus penneri*-2 against *Vibrio anguillarum* 4347 (78.07%) and *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 against *Vibrio alginolyticus* (40.27%). The rest of the probiotic strains tested produce a decrease in the growth in a range between 20 and 30%.

Discussion

Use of living organisms that may show an antagonistic effect is a very useful tool to prevent against different pathogens of aquaculture (Hjelm et al. 2004; Makridis et al. 2005). Probiotics have been used in terrestrial animals and in humans for many years (Irianto and Austin 2002). Nowadays, the application of probiotics is used as a control method and also as a new mechanism of natural prevention against diseases of fish caused by pathogenic bacteria (Nikoskelainen et al. 2001).

Three relevant fish species for marine aquaculture of Spain, seabass (*D. labrax*), meagre (*A. regius*) and common sole (*S. solea*) were used in this work with the aim of isolate and selecting different strains with probiotic activity. The evaluation and characterization of the potential probiotic strains were carried out through the analysis of its mechanism of action *in vitro*.

The fact that the isolated strains produces an inhibitory effect on the growth of different marine fish pathogens of the genus *Vibrio* is the method that allowed us the initial pre-selection, to continue later with a battery of complementary

tests, methodology indicated by previous works (Pan et al. 2008). A total of 7/156 isolates showed inhibitory capacity against different vibrio strains, highlighting the strain *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1, which produced inhibition of bacterial growth of all pathogenic strains analysed (Table 2). Production of antibacterial substances allows us to determine if the inhibitory effect on pathogens observed in previous tests, is produced by extracellular substances. In our study, only 1/7 isolated strains analysed (*Shewanella putrefaciens*) produced extracellular substances able of inhibiting all fish pathogens tested. Previous studies have suggested that the inhibitory effects could be caused by the production of volatile organic acid compounds and bacteriocins (Balcázar et al. 2007).

In this study, the effect of bile and pH as a prior step to adhesion were evaluated, trying to simulate the passage of the bacteria through the gastrointestinal tract for subsequent colonization in the intestines (Robertson et al. 2000; Irianto and Austin 2002; Nikoskelainen et al. 2003), in order its long-term effect was observed, or add it continuously in the diet (Duwat et al. 2000; Nikoskelainen et al. 2001). The viability of our potential probiotic strains analysed has been affected by the action of sea bass bile. However, the real concentration of bile in fish is unknown, therefore an overestimation has been made, using 10% fresh bile, a much higher concentration than used in the assays with humans (3%) (Sorroza et al. 2012; Nikoskelainen et al. 2001). Low pH values affect the viability of the strains analysed, showing rates below 50% at pH 3, except the *Proteus penneri*-1 (63.5%), but this does not mean that these strains are unable to survive and colonize the intestine. We must consider that the strains are not directly exposed to stomach secretions since the bacteria will mix with food, and in addition, other elements are involved in digestion, such as the number of daily food intakes (Nikolopoulou et al. 2011; Nikoskelainen et al. 2001). In fact, the tolerance limit to acid medium is not always a previous condition of bacterial strains to be selected as probiotics.

Selected probiotics are able to increase their initial concentration, after 24 h of incubation using intestinal and skin mucus of sea bass as the sole source of nutrients. This means that the probiotic could be kept in the intestine and colonize (Ringø et al. 2010). The capacity of adhesion to the mucosa and its subsequent growth in the mucus of the preselected probiotics is a very important property to enable colonization and persistence in the intestinal tract (Collado et al. 2007; Verschuere et al. 2000). We analysed the adhesion of the strains both to the intestinal mucus and to the mucus of skin of sea bass, showing very high values for the strain *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-3, and values below 10% for the rest of the strains. The hydrophobicity of the cell surface is related with the adherence of microorganisms beneficial to the intestinal tract of fish (Vázquez-Juárez et al. 1994), and in our study, 5/7 strains showed hydrophobicity activity.

Before beginning with subsequent studies, it is absolutely necessary to have a good enough collection of new bacterial strains showing some particular probiotic effect in order to test all together at the same conditions by *in vivo* studies. Here is where the importance of the present study lies.

In conclusion, in this work we have performed a screening in different marine species of fish with interest for aquaculture,

looking for bacterial strains with possible probiotic effect. By *in vitro* tests 7 strains were selected with inhibitory activity against different pathogenic strains of the genus *Vibrio*, which could be suitable to carry out the *in vivo* studies. We also highlight the results obtained with strain *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*-1 isolated from meagre, which has a marked inhibitory effect against all the vibrio strains analysed, and shows the adequate conditions for adhesion and colonization in fish intestines.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This work was supported by the Spanish Government [grant number AGL2014-54683-R].

ORCID

Daniel Padilla  <http://orcid.org/0000-0002-6678-5029>
 José Luis Martín Barrasa  <http://orcid.org/0000-0002-3280-9838>
 Begoña Acosta-Hernández  <http://orcid.org/0000-0002-0397-4244>
 Natalia García Álvarez  <http://orcid.org/0000-0001-5027-3072>
 Inmaculada Rosario Medina  <http://orcid.org/0000-0002-0061-6900>
 Soraya Déniz  <http://orcid.org/0000-0003-0201-8338>
 Fernando Real  <http://orcid.org/0000-0001-6526-0354>

References

- Abdelkhalik NK, Eissa IA, Ahmed E, Kilany OE, El-Adl M, Dawood MAO, Hassan AM, Abdel-Daim MM. 2017. Protective role of dietary *Spirulina platensis* against diazinon-induced Oxidative damage in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. *Environ Toxicol Pharmacol*. 54:99–104. DOI:10.1016/j.etap.2017.07.002.
- Austin B, Austin DA. 2012. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild animals, 5th ed. Dordrecht: Springer.
- Austin B, Baudet E, Stobie M. 1992. Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *J Fish Dis*. 15(1):55–61. DOI:10.1111/j.1365-2761.1992.tb00636.x.
- Balcázar JL, Vendrell D, De Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Gironés O, Múzquiz JL. 2007. *In vitro* competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. *Vet Microbiol*. 122(3–4):373–380. DOI:10.1016/j.vetmic.2007.01.023.
- Banerjee G, Ray AK. 2017. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Res Vet Sci*. 115:66–77. DOI:10.1016/j.rvsc.2017.01.016.
- Bergh O, Nilsen F, Samuelsen O. 2001. Diseases, prophylaxis and treatment of the Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*: a review. *Dis Aquat Org*. 48:57–74. DOI:10.3354/dao048057.
- Bizzini A, Greub G. 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect*. 16:1614–1619. DOI:10.1111/j.1469-0691.2010.03311.x.
- Chen F, Liu P, Lee K. 2000. Lethal attribute of serine protease secreted by *Vibrio alginolyticus* strains in Kuruma prawn. *Penaeus Japonicus*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 55(1–2):94–99. DOI:10.1515/znc-2000-1-218.
- Collado MC, Grześkowiak L, Salminen S. 2007. Probiotic strains and their combination inhibit *in vitro* adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Curr Microbiol*. 55(3):260–265. DOI:10.1007/s00284-007-0144-8.
- Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 36:380–407. DOI:10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
- Duwat P, Cesselin B, Sourice S, Gruss A. 2000. *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival. *Int J Food Microbiol*. 55(1–3):83–86. DOI:10.1016/s0168-1605(00)00179-3.
- Etyemez M, Balcázar JL. 2016. Isolation and characterization of bacteria with antibacterial properties from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Res Vet Sci*. 105:62–64. DOI:10.1016/j.rvsc.2016.01.019.
- Gatesoupe F. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*. 180(1–2):147–165. DOI:10.1016/S0044-8486(99)00187-8.
- Hagi T, Hoshino T. 2009. Screening and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from cultured common carp intestine. *Biosci, Biotechnol, Biochem*. 73(7):1479–1483. DOI:10.1271/bbb.80746.
- Hjelm M, Bergh Ø, Riaza A, Nielsen J, Melchiorson J, Jensen S, Gram L. 2004. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Syst Appl Microbiol*. 27(3):360–371. DOI:10.1078/0723-2020-00256.
- Ibrahem MD. 2015. Evolution of probiotics in aquatic world: potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives. *J Adv Res*. 6(6):765–791. DOI:10.1016/j.jare.2013.12.004.
- Irianto A, Austin B. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis*. 25(6):333–342. DOI:10.1046/j.1365-2761.2003.00414.x.
- Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*. 274(1):1–14. DOI:10.1016/j.aquaculture.2007.11.019.
- Kim D, Austin B. 2008. Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Lett Appl Microbiol*. 47(3):141–147. DOI:10.1111/j.1472-765X.2008.02401.x.
- Lazado CC, Caipang CMA. 2014. Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish Shellfish Immunol*. 39(1):78–89. DOI:10.1016/j.fsi.2014.04.015.
- Makridis P, Martins S, Vercauteren T, Van Driessche K, Decamp O, Dinis M. 2005. Evaluation of candidate probiotic strains for gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*) using an *in vivo* approach. *Lett Appl Microbiol*. 40(4):274–277. DOI:10.1111/j.1472-765X.2005.01676.x.
- Nikolopoulou D, Moutou K, Fountoulaki E, Venou B, Amidou S, Alexis M. 2011. Patterns of gastric evacuation, digesta characteristics and pH changes along the gastrointestinal tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 158(4):406–414. DOI:10.1016/j.cbpa.2010.11.021.
- Nikoskelainen S, Ouwehand AC, Bylund G, Salminen S, Lilius E. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol*. 15(5):443–452. DOI:10.1016/s1050-4648(03)00023-8.
- Nikoskelainen S, Salminen S, Bylund G, Ouwehand AC. 2001. Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Appl Environ Microbiol*. 67(6):2430–2435. DOI:10.1128/AEM.67.6.2430-2435.2001.
- Ocaña VS, Bru E, Ruiz Holgado AAP, Nader-Macias ME. 1999. Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. *J Gen Appl Microbiol*. 45(5):203–212. DOI:10.2323/jgam.45.203.
- Olsson JC, Westerdahl A, Conway PL, Kjelleberg S. 1992. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*)- and dab (*Limanda limanda*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl Environ Microbiol*. 58(2):551–556.
- Pan X, Wu T, Zhang L, Song Z, Tang H, Zhao Z. 2008. *In vitro* evaluation on adherence and antimicrobial properties of a candidate probiotic *Clostridium butyricum* CB2 for farmed fish. *J Appl Microbiol*. 105(5):1623–1629. DOI:10.1111/j.1365-2672.2008.03885.x.
- Pillay TVR. 2004. Pathogens in the aquatic environment. In: Pillay T.V.R, editor. *Aquaculture and the environment*. Oxford: Blackwell; p. 92–96.
- Ringø E, Løvmo L, Kristiansen M, Bakken Y, Salinas I, Myklebust R, Mayhew TM. 2010. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquac Res*. 41(4):451–467. DOI:10.1111/j.1365-2109.2009.02339.x.
- Robertson P, O'Dowd C, Burrells C, Williams P, Austin B. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*. 185(3–4):235–243. DOI:10.1016/S0044-8486(99)00349-X.

- Sharifuzzaman SM, Austin B. 2017. Probiotics for disease control in aquaculture. In: Austin B., Newaj-Fyzul A, editors. *Diagnosis and control of diseases of fish and shellfish*. John Wiley; p. 189–222.
- Sica MG, Brugnoli LI, Marucci PL, Cubitto MA. 2012. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming. *Antonie van Leeuwenhoek*. 101(4):869–879. DOI:10.1007/s10482-012-9703-5.
- Sorroza L, Padilla D, Acosta F, Román L, Grasso V, Vega J, Real F. 2012. Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. *Vet Microbiol*. 155(2–4):369–373. DOI:10.1016/j.vetmic.2011.09.013.
- Van Doan H, Hoseinifar SH, Dawood MAO, Chitmanat C, Tayyatham K. 2017. Effects of *Cordyceps militaris* spent mushroom substrate and *Lactobacillus plantarum* on mucosal, serum immunology and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol*. 70:87–94. DOI:10.1016/j.fsi.2017.09.002.
- Vázquez-Juárez R, Andlid T, Gustafsson L. 1994. Cell surface hydrophobicity and its relation to adhesion of yeasts isolated from fish gut. *Colloids Surf B*. 2(1–3):199–208. DOI:10.1016/0927-7765(94)80035-9.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev*. 64(4):655–671. DOI:10.1128/membr.64.4.655-671.2000.
- Yan J, Guo C, Dawood MAO, Gao J. 2017. Effects of dietary chitosan on growth, lipid metabolism, immune response and antioxidant-related gene expression in *Misgurnus anguillicaudatus*. *Benefic Microbes*. 8:439–449. DOI:10.3920/BM2016.0177.

[Click here to view linked References](#)

Probiotic properties of *Alcaligenes faecalis* isolated from *Argyrosomus regius* in experimental peritonitis

¹AI Gutiérrez-Falcón (ORCID iD: 0000-0002-2672-9356)

^{2,3}AM Ramos-Nuez

⁴A Espinosa de los Monteros y Zayas (ORCID iD: 0000-0002-7736-3139)

¹DF Padilla Castillo (ORCID iD: 0000-0002-6678-5029)

^{2,3}M Isabel García-Laorden (ORCID iD: 0000-0001-6270-6306)

⁵FJ Chamizo López (ORCID iD: 0000-0003-1328-1924)

¹F Real Valcárcel (ORCID iD: 0000-0001-6526-0354)

⁵F Artilles Campelo (ORCID iD: 0000-0003-3019-8604)

⁵A Bordes Benítez (ORCID iD: 0000-0003-3243-7402)

⁶P Nogueira Salgueiro (ORCID iD: 0000-0002-8029-2685)

⁶C Domínguez Cabrera

⁷JC Rivero-Vera

⁸JM González-Martín (ORCID iD: 0000-0001-6816-4157)

⁹J Martín Caballero (ORCID iD: 0000-0002-1579-2739)

¹⁰R Frías Beneyto (ORCID iD: 0000-0001-7569-5693)

^{2, 3}Jesús Villar (ORCID iD: 0000-0001-5687-3562)

^{* 1,3,11}JL Martín-Barrasa, (ORCID iD: 0000-0002-3280-9838)

From

¹Animal Infectious Diseases and Ictiopathology, University Institute of Animal Health and Food Safety, University of Las Palmas de Gran Canaria, Carretera de Trasmontaña s/n, 35416 Arucas, Spain.

²CIBER de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Monforte de Lemos 3-5, Pabellón 11, 28029 Madrid, Spain.

³Multidisciplinary Organ Dysfunction Evaluation Research Network, Research Unit, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Barranco de la Ballena s/n, 35019 Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

⁴Morphology Department. University Institute of Animal Health and Food Safety (IUSA). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Arucas. Las Palmas. Spain.

⁵Microbiology Department. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr Negrín, Barranco de la Ballena s/n, 35019 Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

⁶Clinical Biochemistry Department. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr Negrín, Barranco de la Ballena s/n, 35019 Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

⁷Pathology Service. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr Negrín, Barranco de la Ballena s/n, 35019 Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

⁸Statistics Service. Research Unit, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr Negrín, Barranco de la Ballena s/n, 35019 Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

⁹Barcelona Biomedical Research Park (PRBB), Barcelona, Spain.

¹⁰Comparative Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

¹¹Animal Facility, Research Unit, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr Negrín, Barranco de la Ballena s/n, 35019 Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

***Corresponding author:** JL Martín-Barrasa, Research Unit, Hospital Universitario de Gran Canaria, Dr. Negrín, Barranco de la Ballena s/n, 35019 Las Palmas de Gran Canaria, Spain. Phone: +(34) 928 449277 / +(34) 650 056569. E-mail address: joseluis.martin@ulpgc.es

ABSTRACT

1
2 A strain of *Alcaligenes faecalis* A12C (*A. faecalis* A12C) isolated from *Argyrosomus regius*, is
3 a probiotic in fish. Previous experiments showed that *A. faecalis* A12C had inhibitory effects on the
4 growth of multidrug-resistant bacteria. We aimed to confirm whether *A. faecalis* A12C is safe and has
5 adequate intestinal colonization in experimental rats, and evaluate its efficacy in an animal model of
6 peritonitis. We used 30 male rats, randomly divided into 6 groups (n=5): three groups (HA7, HA15,
7 HA30) received *A. faecalis* A12C in drinking water (6×10^8 CFU/mL) for 7 days, and three control
8 groups received drinking water only. All groups were evaluated at 7, 15, and 30 days. Survival after *A.*
9 *faecalis* A12C administration was 100% in all groups. Mild eosinophilia (1.5%, $p < 0.01$) and increased
10 aspartate aminotransferase (86 IU/l, $p < 0.05$) were observed in HA7, followed by progressive
11 normalization. No histological signs of organ injury were found. We observed significant *E. coli* decline
12 in feces, parallel to an increase in *A. faecalis* A12C at 7 days. *E. coli* had a tendency to recover initial
13 values while *A. faecalis* A12C disappeared from the intestinal microbiota at 30 days. To evaluate its
14 efficacy against peritonitis, we studied two additional groups of animals: IA group pretreated with *A.*
15 *faecalis* A12C before *E. coli* intra-abdominal inoculation, and IC group inoculated with no *A. faecalis*
16 A12C. We found an increase in C-reactive protein, alanine aminotransferase, urea, and eosinophils in
17 IC animals when compared to IA. Peritonitis was more evident in IC than in IA animals. Our findings
18 suggest that *A. faecalis* A12C altered clinically relevant parameters in sepsis, and was associated with
19 a lesser spread of infection.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

Keywords

41
42
43
44
45 *Alcaligenes faecalis*; peritonitis; probiotic; *Argyrosomus regius*; rat; *Escherichia coli*.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3 **DECLARATIONS**
4

5
6 **Competing interests:** All authors certify that they have no affiliations with or involvement with any
7 organization or entity with financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials
8 discussed in this manuscript.
9

10
11
12 **Author's contributions:** **Conceptualization:** Martín-Barrasa JL, Padilla Castillo DF, Real Valcárcel
13 F; **Methodology:** Gutiérrez Falcón AI, Martín-Barrasa JL, Ramos-Nuez AM, Padilla Castillo DF, Bordes
14 Benítez A, Domínguez Cabrera C, Martín Caballero J, Villar J; **Experiments and Data analysis:**
15 Martín-Barrasa JL, Gutiérrez Falcón AI, Espinosa de los Monteros y Zayas A, Rivero-Vera JC,
16 Ramos-Nuez AM, García-Laorden MI, Chamizo López FJ, Artilles Campelo F, Nogueira Salgueiro P,
17 González-Martín JM; **Writing the manuscript and reviewing:** Martín-Barrasa JL, Martín Caballero J,
18 Villar J, Frías Beneito R; **Funding:** Martín-Barrasa JL, Real Valcárcel F; **Resources:** Martín-Barrasa
19 JL, Real Valcárcel F, Bordes Benítez A, Domínguez Cabrera C, Espinosa de los Monteros y Zayas A,
20 Villar J; **Supervision:** Martín-Barrasa JL. All authors read and approved the final manuscript.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 **Funding:** This study was funded in part by grants from the Fundación Canaria de Investigación
33 Sanitaria, Spain (PIFUN30/18) and by Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (AGL2014-
34 54683-R). A.G.F. was a recipient of a predoctoral grant from the University of Las Palmas de Gran
35 Canaria (PIFULPGC-2015-CCSALUD). The funding agencies have no role in the design of the study,
36 collection, analysis or interpretation of data, or in the writing of the manuscript.
37
38
39
40
41
42

43 **Ethics approval:** The animal trial was carried out according to the regulations approved by the Animal
44 Care Committee of Hospital Universitario de Gran Canaria, Dr. Negrín (Cod. REGA: ES
45 350160024512)
46
47
48
49

50 **Consent to participate:** not applicable.
51

52 **Consent for publication:** not applicable.
53

54 **Data Availability Statement:** The datasets generated and/or analysed during the current study are
55 available from the corresponding author on reasonable request.
56
57
58

59 **Code availability:** not applicable
60
61
62

INTRODUCTION

1 The abdomen is the most common source of sepsis and is associated with an unacceptably
2 high morbidity and mortality [1]. Sepsis is defined as a life-threatening organ dysfunction caused by a
3 deregulated host response to infection [2]. Despite developments in antisepsis and antibiotic
4 prophylaxis, septic complications are common in surgical patients. Many postoperative infections are
5 caused by intestinal bacteria, and the intestinal barrier and patient's indigenous intestinal microbiota
6 facilitate the development of complications such as peritonitis [3,4] that could be fatal [5]. *Escherichia*
7 *coli* (*E. coli*) is the most common pathogen in abdominal sepsis, in both human and rodents [6–9].
8 Direct administration of *E. coli* is one of the classic experimental models of peritonitis in rats [4].

9 Probiotics are living microorganisms that confer health benefits to the host through an
10 interaction with the intestinal microbiota and the immune function when administered in adequate
11 doses [10]. A variety of species of probiotics (including *Bifidobacterium spp*, *Lactobacillus spp*,
12 *Enterococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Bacillus spp*, and yeasts) have shown to benefit human and
13 animal health both *in vivo* and *in vitro* [9, 11–13]. There are increasing number of studies evaluating
14 the benefits of new candidate bacterial species as probiotics [14–18]. Studies with probiotics strains of
15 *Lactococcus spp*, *Enterococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Vibrio spp*, *Bacillus spp*, *Pseudomonas spp*,
16 *Aeromonas spp* [19–21] have revealed benefits for their natural hosts, by increasing immune response
17 against an specific pathogen, production of inhibiting compounds, or competing for fixation sites.

18 The use of probiotics and immune stimulants has had a remarkable increase in aquaculture
19 due to the trend of reducing the use of antibiotics. Currently, probiotics and immune stimulants are
20 considered candidates to control fish diseases. In pilot studies from our group, strains of *Alcaligenes*
21 *faecalis*, isolated from *Argyrosomus regius* gills, have shown *in vitro* excellent conditions as potential
22 probiotic in fish due to inhibitory activity against the main bacterial fish pathogens [22]. These *in vitro*
23 results have been confirmed in several *in vivo* experiments, reporting a potent protective effect after
24 infection with the marine pathogen *Vibrio anguillarum*. In preliminary experiments with several
25 multidrug-resistant bacteria from hospital origin, we found that *Alcaligenes faecalis* A12C (*A. faecalis*
26 A12C) had inhibitory effects on the growth of *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter*
27 *cloacae*. Antibiotics are the first option to control infectious diseases due to their rapid action and
28 availability. However, despite of being an effective strategy in the beginning, the negative effects on
29 environmental and public health justify the need of developing new strategies for the prevention and
30

treatment of bacterial infections in both human and veterinary medicine. Based on these pilot studies,
we aimed to evaluate the potential therapeutic effect of *A. faecalis* A12C in an experimental, clinically
relevant animal model of peritonitis.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

MATERIALS AND METHODS

Animals

This study was approved by the Local Animal Ethics Committee, Hospital Universitario Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, and followed the recommendations of the European Commission (2010/63/EU), and the Spanish Legislation (Law 53/2013) for the protection of animals for scientific purposes. We used forty-two males Crl:Sprague-Dawley® (SD) rats of 12 weeks of age, obtained from a breeding colony kept under semi-barrier conditions from the animal facilities of Hospital Universitario de Gran Canaria, Dr. Negrín, were a third generation of a colony from Charles River (Barcelona, Spain). Rats were housed in pairs in mini-aisled cages of 1500 cm² (480 x 375 x 210 mm) (Tecniplast, Buguggiate, Italy) with enrichment consisting of an igloo and some nesting material. Cage change was undertaken twice a week. Rats were fed with a diet consisted of rat chow pellets (Teklad® Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan, Barcelona, Spain) and drinking water (Fonteide®, S/C de Tenerife, Spain) were available *ad libitum*. The light/dark cycle was 12/12 h. Room temperature was maintained at 21±1°C and relative humidity was 55±5% with an air exchange rate of 15 times/h. All the rats were acclimatized for 21 days and were determined to be healthy on the basis of individual physical examinations, and pathogen-free based on the results of routine microbiological screening performed on the colony in accordance with European recommendations[23].

Preparation of *A. faecalis* A12C for administration to rats

The probiotic strain *A. faecalis* A12C was isolated from *Argyrosomus regius* gills at the Instituto de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria of the University of Las Palmas de Gran Canaria. The strain was identified at the Microbiology Department of the Hospital Universitario de Gran Canaria Dr Negrín by means of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) system (Vitek®MS, Biomerieux, Madrid, Spain). *A. faecalis* A12C strain cultures were stored at –80 °C with 20% glycerol (v/v) addition in Brain Heart Infusion broth (PanReac-AppliChem, Darmstadt, Germany). Fresh cultures were made prior the assays and the strain was aerobically incubated in Trypticase Soy with 5% sheep blood (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) medium for 18 h at 37 °C with shaking (120 rpm) each two days. Before the challenge, the bacteria were centrifuged at 2500×g for 10 min and washed three times with sterile 0.9% saline solution. The bacteria were resuspended in drinking mineral water (Fonteide®) and bacterial

1 concentration was measured with a spectrometer at 600 nm. Mineral water (Fonteide®) was used to
2 adjust the suspension to 6×10^8 CFU/mL. Finally the suspension was stored at 4°C and protected from
3
4 light.
5
6

7 ***E. coli* inocula preparation**

8
9 The *E. coli* strain used in this study to produce peritonitis was isolated from intestinal
10 microbiota of healthy Sprague Dawley rats from the animal facility of the Hospital Universitario de
11 Gran Canaria, Dr. Negrín. The MALDI-TOF MS (Vitek®MS, Biomerieux) technique [24] was used for
12 the strain identification. The strain was designated as *E. coli* EBETAN-1 HUGCDN. *E. coli* strain
13
14 cultures were stored at -80 °C with 20% glycerol (v/v) addition in Brain Heart Infusion broth
15 (PanReac-AppliChem). Fresh cultures were made prior the assays and the strain was aerobically
16 incubated in Trypticase Soy broth (Becton Dickinson) medium for 18 h at 37 °C with shaking
17 (120 rpm). Before the challenge, the bacteria were centrifuged at 2500xg for 10 min and washed three
18 times with sterile 0.9% saline solution. The bacterial concentration was measured with a spectrometer
19 at 600 nm. Sterile 0.9% saline solution was used to adjust the suspension to the desired bacterial
20 concentration (2×10^8 CFU/ml).
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 **Experimental design**

33
34 This study was performed in two phases. First, 30 healthy rats were randomly divided into 6
35 groups: (i) healthy (negative controls-1), assessed at 7 days (HC7, n=5), 15 days (HC15, n=5), and
36 30 days (HC30, n=5) after the first dose of tap water; (ii) animals treated with *A. faecalis* A12C
37 (positive controls-1) and assessed after the first dose of probiotics at 7 days (HA7, n=5), at 15 days
38 (HA15, n=5), and at 30 days (HA30, n=5). Animals in groups HA7, HA15 and HA30 received the
39 probiotic strain *A. faecalis* A12C in the drinking water (Fonteide®) during seven consecutive days.
40 Simultaneously, we administered 2 mL of the same bacterial suspension every 48 h during the first 7
41 days through an orogastric tube. HC group animals also received the same volume of water
42 (Fonteide®) without probiotic via an orogastric tube. Bottles with the bacterial suspension or only water
43 were replenished daily.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

54 In a second phase, 12 animals were randomly divided into two groups: (i) infected control group (IC)
55 (n=6), in which *A. faecalis* A12C was not administered (negative control-2) and peritoneal infection
56 was induced as described below, and (ii) group infected and pretreated with *A. faecalis* A12C (IA)
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

(n=6), in which the probiotic was administered during the first 7 days (positive control-2) in the drinking water (6×10^8 CFU/mL). Simultaneously, 2 mL of the same bacterial suspension or water (Fonteide®) were administered respectively to the IA or the IC groups every 48 h during the first 7 days through an orogastric tube.

Animals were euthanized at 7, 15, or 30 days after probiotic or mineral water administration (First phase) and at 7 days post *E. coli* inoculation in IA and IC (second phase). Fig. 1 summarizes the experimental design.

Peritonitis model

For induction of peritonitis, we used a classical model of intraabdominal sepsis [25]. We inoculated an *E. coli* strain isolated from intestinal microbiota of rat as described above. We administered 2×10^8 CFU/animal intraperitoneally using a 25G needle. We delivered analgesia with 0.05 mg/kg buprenorphine/12h subcutaneous (Buprex®, Mundipharma, Limburg, Germany) during 3 days after the experimental infection. Animals were evaluated every 12h according to signs shown in table 1 [26].

Body temperature, weight and samples collection

At the end of each experimental phase (7th day post-inoculation with *E. coli*, or at 7th, 15th, 30th day in control animals), animals were weighed, their body temperature was measured in the perianal area using an infrared digital thermometer (T-One. CA-MI srL., Parma, Italy) and anesthetized with 0.3/0.3 mg/kg subcutaneously of a combination of medetomidine (Domtor®, Orion Pharma, Espoo, Finland) and fentanyl (Fentanest®, KERN Pharma, Terrassa, Spain). When animals reached the anesthetic plane, the following samples were collected: blood from external jugular vein for hemogram and biochemistry; intracardiac blood for blood culture and serum collection; urine by direct puncture of urinary bladder for urine culture; bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from the right lung (2-3 mL) for microbiological culture; liver, kidney, spleen, duodenum, pancreas, jejunum, mesenteric lymph nodes, thymus, and lung for histological evaluation. Rats were euthanized by exsanguination after cutting the caudal vena cava and abdominal aorta.

1
2
3 **Blood count and blood chemistry**

4
5 Hematological parameters (hematocrit, red blood cells, platelets, total white cells,
6 lymphocytes, monocytes, neutrophils, monocytes, eosinophils and basophils) were counted on whole
7 blood samples in EDTA K3 using an autoanalyzer Cell-Dyn Sapphire (Abbott Laboratories, Chicago,
8 Illinois,USA). In venous blood, measurements of serum biochemical parameters, including alanine
9 aminotransferase (ALTL), aspartate aminotransferase (ASTL), creatinine (CREA), urea (UREA), and
10 total bilirubin (TBIL) were performed on a Cobas 8000 Modular Analyzer Series (Roche Diagnostics,
11 Basel, Switzerland). Blood obtained by cardiac puncture was centrifuged and serum was collected and
12 stored at -80°C. Serum levels of C-reactive protein (CRP), were measured by ELISA using a rat
13 DuoSet ELISA kit and DuoSet Ancillary Reagent Kit2 (R&D Systems, Abingdon, UK) following
14 manufacturer's protocol.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 **Bacterial counts in faeces**

27
28 To determine the survival capability of probiotic *A. faecalis* A12C in the intestine and its
29 influence on the growth of *E. coli* from faecal microbiota, we assessed CFU/g stool of both bacterial
30 species. Faeces were collected from the rectum of animals by abdominal massage at the beginning
31 and at the end of each experimental period. To examine bacterial loads, serial 10-fold dilutions were
32 made in 0.9% sterile saline and plated on Brain-Heart infusion Agar (PanReac-AppliChem) modified
33 by adding 4.5 g/100 mL of NaCl, 64 mg/L of vancomycin (SALA, Barcelona, Spain) and 0.02 g/L of
34 bromothymol blue (MERCK, Darmstadt, Germany). After incubation at 37°C for 24h (*E. coli*) or 72h (*A.*
35 *faecalis* A12C), we calculated total viable counts of original samples (CFU/g faeces). Colonies were
36 separated and isolated 2-3 times. We identified bacterial species using colony morphology and Gram
37 stain. MALDI-TOF MS (Vitek®MS, Biomerieux) technique [24] was used for advanced identification.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 **Microbiological analysis**

50
51 Samples were processed within 2 h of collection. To investigate aerobic microorganisms, 100
52 µL of urine, blood and BALF from each animal were cultured on 10 mL Brain-Heart Infusion broth
53 (PanReac-AppliChem) overnight at 37°C; 25 µL from these cultures were plated onto CLED,
54 MacConkey, Mannitol Salt agar, and Sabouraud Dextrose Agar (all four from PanReac-AppliChem),
55 and incubated for 24 h at 37°C. To investigate anaerobic and anaerobic bacteria, 3 mL of blood were
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 inoculated on 10 mL of BD BACTEC Lytic Anaerobic (Becton Dickinson) and incubated in BD
2 BACTEC FX blood culture system (Becton Dickinson) during 5 days. If any sign of growth was
3 detected, a subculture was made on Blood Chocolate and McConkey agar (both of them from
4 Beckton Dickinson), and plates were incubated for 48 h at 37°C in 5% CO₂ atmosphere and on
5 Brucella Blood Agar with Hemin and Vitamin K1 (Beckton Dickinson) incubated for 4 days at 37°C in
6 anaerobiosis. Bacterial species were identified using colony morphology and Gram stain. We used
7 MALDI-TOF MS (Vitek®MS, Biomerieux) for advanced identification.
8
9
10
11
12
13

14 **Histological evaluation**

15
16 Organ samples were fixed in 4% formalin for 24 h, embedded in paraffin and cut into 4 μ
17 sections for histological study. Slides were stained with hematoxylin-eosin and examined under light
18 microscope. Slides were evaluated by two pathologists blinded to experimental groups. In all organs,
19 the presence of bacteria inside vessels (microscopic observation of blue bacterial plungers inside the
20 vessels, constituted by small rod-shapes), parenchymal disorganization, interstitial edema, leukocyte
21 infiltration, tissue necrosis, and interstitial hemorrhage were evaluated. Lung injury was determined
22 based on alveolar septa thickening and pleuritis. Heart damage was examined if inflammatory
23 response was present in the epicardium and/or myocardium. Intestinal damage was evaluated at
24 mucosal and serosal levels. Peritoneal injury was assessed based on a severity score of
25 histopathological peritonitis [27], as scores of 0, 1, 2 and 3, according to findings in Table 2.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **Statistical analysis**

39
40 Analyses were done using Statistical Package R 2019 version 3.5.3 (R Foundation for Statistical
41 Computing, Vienna, Austria). To check the normality of quantitative variables, the Shapiro-Wilk test
42 was used. Continuous variables are expressed as medians and 25th and 75th percentiles.
43 Comparisons between more than two groups were performed using Kruskal-Wallis test, with
44 Bonferroni correction for multiple comparisons when needed. Comparisons between two independent
45 groups were performed using Mann–Whitney U test. Data are expressed as box-and whisker
46 diagrams. All tests were two-tailed and statistical significance was considered at P-value <0.05.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

RESULTS

A. faecalis A12C safety

Healthy animals pretreated during a week with *A. faecalis* A12C (positive controls-1) and assessed at 7, 15, and 30 days after the first dose of *A. faecalis* A12C (HA7, HA15, and HA30) did not show significant changes in body temperature or weight, compared to negative controls-1 (supplementary data). Survival after *A. faecalis* A12C administration was 100% in all groups. No significant changes were found in most hematological (table 3) and biochemical (table 4) parameters. All positive controls-1 (HA7, HA15, HA30) had similar values compared to negative controls-1 (HC) with the exception of blood eosinophils, CREA and ASTL. An increase of eosinophils and CREA at 7 days after *A. faecalis* A12C administration was observed, followed by a progressive normalization. However, a significant decrease of ASTL was observed after the administration of *A. faecalis* A12C which was normalized throughout the study period (Table 3). No histological signs of injury were found in any organ of different groups.

Gut colonization conditions of A. faecalis A12C

In the positive controls-1 (HA7, HA15, and HA30), concentration of *E. coli* and *A. faecalis* A12C C in feces showed a significant decrease in *E. coli*, parallel to an increase in *A. faecalis* A12C, 7 days after the administration of this strain (Fig 2). Subsequently, *E. coli* concentration had a tendency to recover the initial values at 30 days, while *A. faecalis* A12C disappeared from the intestinal microbiota at 30 days.

Clinical evolution

All animals in both groups (IA and IC) had a 100% survival at 15 days after the experiments. However, there was a greater presence of animals with signs of discomfort in IC group (negative control-2) compared to IA group (positive control-2). Ruffled fur was observed in all IC animals, and ocular discharge in 3 of them, while ruffled fur was only observed in 3 animals of the IA group. In both cases, the signs disappeared with analgesic treatment during the first three days post-inoculation. In Group IC, a not significant decrease in body weight was observed at day 15 compared to day 7. However, in group IA a not significant increase was observed in the same period of time (Fig 3). The only significant changes in serum biochemistry were an increase in ALTL, UREA, and eosinophils in IC respect to IA (Fig 4).

1
2
3 **Microbiological control**

4
5 All animals from IC and IA had negative urine, BAL, and blood cultures at 7 days post-infection
6
7 with *E. coli*, except for one animal in group IC in which *Aerococcus viridans* and *Staphylococcus*
8
9 *xylosus* were isolated in the blood culture.

10
11
12 **Histological evaluation**

13
14 In the IC group, four animals were classified with a peritonitis score of 1, and two rats with a
15
16 score of 2. Dilatation of subserosal capillaries, dulling of peritoneal surface, and swelling of
17
18 mesothelial cells and focal desquamation of mesothelial cells, thin exudative fibrin film and mild-to-
19
20 moderate mixed polymorphonuclear infiltrates were observed in these animals. These lesions were
21
22 more evident in the peritoneum close to mesenteric lymph nodes, splenic hilum and jejunum.
23
24 However, lesions compatible with peritonitis were only found in one animal from group IA, which was
25
26 scored with a value of 1. On other hand, except for the peritoneum, no significant histological changes
27
28 were observed in any of the organs analyzed in both groups. Representative histological lesions are
29
30 showed in Fig 5.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

DISCUSSION

1 The major findings of our study are that *A. faecalis* A12C, isolated from *Argyrosomus regius*, is
2 safe and has marked effects on the spread of infection in a clinically relevant experimental model of
3 peritonitis. To the best of our knowledge, this is the first study exploring the probiotic effects of *A.*
4 *faecalis* on clinical, biochemical, and pathological parameters in an animal model of peritonitis.
5
6

7
8
9 A variety of probiotic species have showed to benefit human and animal health, both *in vivo*
10 and *in vitro* [9, 11–13, 16, 28–30]. Although lactic acid bacteria have been the most widely used group
11 of probiotics in human and veterinary medicine, studies evaluating other bacterial species with
12 possible probiotic use are increasingly frequent [14–16, 18]. *A. faecalis* is an aerobic, non-fermentative,
13 oxidase-positive, non-encapsulated, Gram-negative rod [31]. It is the most frequently isolated member
14 of the *Alcaligenaceae* family in the clinical laboratory, and it is present in soil and water, in human
15 intestinal microbiota, and in hospital environments [31, 32]. Some strains have been reported as
16 cause of sporadic nosocomial infections [33, 34]. Some studies refer to an eosinophilic response
17 related to alveolitis in humans caused by *A. faecalis* inhalations [35]. Since most probiotic health
18 benefits are strain specific, potential risks are also strain specific. Therefore, generalizing a health risk
19 to probiotics as a class is incorrect, although we do not dispute that there are certain risk groups (e.g.
20 severe immune-compromised patients) where probiotic use should be carefully monitored.
21
22

23
24 Several experimental and clinical studies reported a decrease in ASTL and ALTL by different
25 probiotics [36–38], but we have not found evidence of an exclusive decrease in ASTL in groups of
26 healthy animals treated with probiotics (positive controls-1) versus healthy animals without
27 administration of probiotics (negative controls-1). It is plausible that *A. faecalis* A12C has a modulating
28 capacity for lipid metabolism, as occurs with other probiotics [39–41]. However, this hypothesis should
29 be evaluated in future studies. CRP is an acute phase protein released in hepatocytes after
30 stimulation of IL-6 and IL-8 in response to acute inflammation, including viral infections, localized
31 bacterial and other inflammatory processes, and is involved in different immune functions. In both
32 experimental and clinical studies on infectious diseases, it has historically been the reference
33 biomarker of inflammatory response and infection [25, 27, 42]. In our study, CPR values, in
34 conjunction with the absence of positive bacterial blood cultures, supports the hypothesis that *A.*
35 *faecalis* A12C offers safety against a possible spread of this microorganism and a potential risk of
36 sepsis. The observation of a significant decrease in the concentration of *E. coli* after 7 days of
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 administration of *A. faecalis* A12C, to a later recovery to initial concentrations once the administration
2 of the probiotic ceases, are consistent with those reported by other authors [43]. Of note, others
3 studies indicated that *Lactobacillus spp* and inulin supplementation in broilers, decreased the numbers
4 of *E. coli* and pH in ileum and cecum [44]. Although the reasons for this suppression are not clear,
5 there are two potential reasons: (i) the decreased bacterial number may result from the inhibition of
6 bacterial proliferation, and (ii) a less bacterial infiltration or promoted bacterial killing [9, 45, 46].
7
8
9

10
11 Some authors have indicated that the route of infection can affect the host response. An
12 immediate and overwhelming injection of bacteria into the peritoneum or blood compartments initiates
13 rapid and distinct responses. A peritoneal infection will primarily induce inflammatory and immune-cell
14 migration into the infected compartment, whereas a blood-borne model of infection will have the
15 greatest immediate effect on endothelium and vascular system, with subsequent spread to organs. In
16 case of blood inoculation with *E. coli*, rapid changes are noted in serum cytokine levels. However,
17 inoculation of the peritoneal cavity with the same dose of *E. coli* does not generate a robust serum
18 cytokine response [25]. In addition, it has been shown that in infectious peritonitis the activity of
19 interleukin-10 (IL-10) protects mice from death [47]. Perhaps those effects, together with the slight
20 decrease in the concentration of our *E. coli* inoculums [4], are the reasons behind the zero mortality in
21 our study.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 Our model of sepsis was valid to evaluate the progression of sick animals. Infected animals
35 not receiving *A. faecalis* A12C (IC) showed clear signs of discomfort, typical of bacterial infections
36 such as ruffled fur, ocular discharge and weight loss [26]. When comparing hematological and
37 biochemical data of animals pretreated with *A. faecalis* A12C inoculated with *E. coli* (IA), a marked
38 reduction in blood eosinophils, urea and ALTL occurred. These findings could be related to an anti-
39 inflammatory and/or immunomodulatory capacity of *A. faecalis* A12C. Although we did not find
40 inflammatory histopathological lesions in kidney or liver, we found moderate inflammation with
41 polymorphonuclear infiltrates in the peritoneum and fatty tissue in rats from infected control group
42 (negative control-2) or IC, which were significantly reduced in IA animals (positive control-2). This
43 inflammatory improvement at the histological level, has also been demonstrated with similar models of
44 peritonitis evaluating different therapies, where the thickness of the peritoneal surface, the
45 desquamation of the mesothelial cells, and the infiltrates of inflammatory cells were evaluated [27].
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

1 the cytosol of the hepatocyte, while ASTL, in addition to the cytosol and mitochondria, is found in the
2 heart, skeletal muscle, kidneys, brain, pancreas, lung, erythrocytes and leukocytes [48]. The
3 elevations in ALTL and urea in our study correlate with those obtained by other authors in similar
4 models of peritonitis with or without probiotic evaluation. [13, 49]. These biochemical and
5 hematological changes corresponded to an increase in CRP in IC when compared to IA groups. Our
6 data suggest a potential anti-inflammatory/immunomodulatory effect of *A. faecalis* A12C.
7

8
9
10
11 The anti-inflammatory potency at the intestinal level of probiotics has been explained in
12 experimental studies by several mechanisms [50], including suppression of apoptosis, epithelial cell
13 proliferation and migration, increase colonic IL-10, or repair of disruptions of enteric
14 neurotransmissions. β -glucans are glucose polymers of high molecular weight naturally present in the
15 cell wall of living organisms such as bacteria, yeast, fungus and plants. They are recognized by the
16 innate immune system. This recognition plays important roles in host defense, and represents specific
17 opportunities for clinical modulation of the host immune response [51]. Some authors have examined
18 the effects of curdlan, a β -(1-3)-glucan derived from *A. faecalis*, on allergic airway inflammation using
19 a murine model of asthma, and suggest that curdlan is capable of inducing IL-10-producing CD4+ T
20 cells and inhibiting the development of eosinophilic airway inflammation [52]. This finding could have
21 some similarity with the decrease of eosinophils in IA animals.
22

23
24 Our study has some limitations and strengths. First, a higher sample size could provide more robust
25 results. Second, we do not know the possible effects that *A. faecalis* A12C may cause in animals after
26 7 days of its administration and the safety and efficacy at different doses. Third, although the use of a
27 semiquantitative scoring system, as the one used in this study for histological evaluation, is quite
28 common, we are aware that such score does not provide a fully quantitative assessment of
29 histopathological alterations, as a morphometrical assessment would do. However, the major strength
30 of this study is that we used a translational model of peritonitis that allowed us to obtain results of
31 clinical relevance with a global vision of the potential therapeutic role of an *A. faecalis* strain.
32

33
34 In summary, our findings suggest that *A. faecalis* A12C could influence clinically relevant
35 parameters in sepsis. Administration of 6×10^8 CFU/mL for 7 days was associated with a lesser spread
36 of infection. Our study may add a piece to the complex puzzle of bacteria-host interactions and new
37 therapeutic possibilities in the prophylaxis of sepsis. However, future studies are necessary to analyze
38 these parameters in more detail.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2 **ACKNOWLEDGEMENTS**

3
4 We would like to thank Mr. Juan Ramirez Verona from the Illustration and Iconography Service at
5
6 Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, and Mr. Miguel Martín Betancor from University of
7
8 Applied Sciences, Berlin, for their technical assistance.
9

10
11
12
13 **REFERENCES**

- 14
15 1. Hecker A, Reichert M, Reuß CJ, et al (2019) Intra-abdominal sepsis: new definitions and
16 current clinical standards. *Langenbeck's Arch Surg* 404:257–271.
17 <https://doi.org/10.1007/s00423-019-01752-7>
18
19 2. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, et al (2016) The third international consensus
20 definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - J Am Med Assoc* 315:801–810.
21 <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
22
23 3. Qin HL, Shen TY, Gao ZG, et al (2005) Effect of lactobacillus on the gut microflora and barrier
24 function of the rats with abdominal infection. *World J Gastroenterol* 11:2591–2596.
25 <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i17.2591>
26
27 4. Shukla P, Verma AK, Dwivedi P, et al (2014) Moxifloxacin-loaded nanoemulsions having
28 tocopheryl succinate as the integral component improves pharmacokinetics and enhances
29 survival in e. Coli -induced complicated intra-abdominal infection. *Mol Pharm* 11:4314–4326.
30 <https://doi.org/10.1021/mp5003762>
31
32 5. Bouza C, López-Cuadrado T (2019) Epidemiology and Trends of Sepsis in Young Adults Aged
33 20-44 Years: A Nationwide Population-Based Study. *J Clin Med* 9:77.
34 <https://doi.org/10.3390/jcm9010077>
35
36 6. Bosscha K, Reijnders K, Hulstaert PF, et al (1997) Prognostic scoring systems to predict
37 outcome in peritonitis and intraabdominal sepsis. *Br J Surg* 84:1532–1534.
38 <https://doi.org/10.1002/bjs.1800841110>
39
40 7. Blanco J, Muriel-Bombín A, Sagredo V, et al (2008) Incidence, organ dysfunction and mortality
41 in severe sepsis: A Spanish multicentre study. *Crit Care* 12:1–14.
42 <https://doi.org/10.1186/cc7157>
43
44 8. Martín-Barrasa JL, Cordovez CM, De Los Monteros Y Zayas AE, et al (2015) Rectal pre-
45 treatment with ozonized oxygen (O3) aggravates clinic status in septic rats treated with
46 amoxicillin/clavulanate. *Enfermedades Infecc y Microbiol Clin Monogr* 33:469–475.
47 <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.09.006>
48
49 9. Gao QY, Liu H Bin, Li DH, Wu SW (2013) Probiotics improve survival of septic rats by
50 suppressing conditioned pathogens in ascites. *World J Gastroenterol* 19:4053–4059.
51 <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i25.4053>
52
53 10. Bielecka M (2006) Probiotics in food. *Chem Funct Prop Food Components, Third Ed* 413–426.
54 <https://doi.org/10.1201/9781420009613.ch16>
55
56 11. Aceti A, Maggio L, Beghetti I, et al (2017) Probiotics prevent late-onset sepsis in human milk-
57 fed, very low birth weight preterm infants: Systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 9:1–
58 21. <https://doi.org/10.3390/nu9080904>
59
60 12. Lazarenko L, Babenko L, Sichel LS, et al (2012) Antagonistic Action of Lactobacilli and
61 Bifidobacteria in Relation to Staphylococcus aureus and Their Influence on the Immune
62 Response in Cases of Intravaginal Staphylococcosis in Mice. *Probiotics Antimicrob Proteins*

4:78–89. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9093-z>

13. Gancarčíková S, Nemcová R, Popper M, et al (2019) The Influence of Feed-Supplementation with Probiotic Strain *Lactobacillus reuteri* CCM 8617 and Alginate on Intestinal Microenvironment of SPF Mice Infected with *Salmonella Typhimurium* CCM 7205. *Probiotics Antimicrob Proteins* 11:493–508. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9413-z>
14. Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L (2006) The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 106:1–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026>
15. Pabari K, Pithva S, Kothari C, et al (2020) Evaluation of Probiotic Properties and Prebiotic Utilization Potential of *Weissella paramesenteroides* Isolated From Fruits. *Probiotics Antimicrob Proteins* 12:1126–1138. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09630-w>
16. Xiao Z, Liu L, Tao W, et al (2018) *Clostridium Tyrobutyricum* Protect Intestinal Barrier Function from LPS-Induced Apoptosis via P38/JNK Signaling Pathway in IPEC-J2 Cells. *Cell Physiol Biochem* 46:1779–1792. <https://doi.org/10.1159/000489364>
17. Annamalai N, Kumar A, Saravanakumar A, et al (2011) Characterization of protease from *Alcaligenes faecalis* and its antibacterial activity on fish pathogens. *J Environ Biol* 32:781–786
18. Román L, Real F, Sorroza L, et al (2012) The in vitro effect of probiotic *Vagococcus fluvialis* on the innate immune parameters of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol* 33:1071–1075. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.06.028>
19. Ringø E, Bendiksen HR, Wesmajervi MS, et al (2000) Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J Appl Microbiol* 89:317–322. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01116.x>
20. Ringø E, Hoseinifar SH, Ghosh K, et al (2018) Lactic acid bacteria in finfish-An update. *Front Microbiol* 9:1–37. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01818>
21. Irianto A, Austin B (2003) Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 26:59–62. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00414.x>
22. Gutiérrez-Falcón A, Padilla D, Ramos Sosa MJ, et al (2020) Characterization in vitro of new bacterial strains showing potentially probiotic crossed effect against vibriosis in relevant fish species for marine aquaculture. *J Appl Anim Res* 48:553–558. <https://doi.org/10.1080/09712119.2020.1844714>
23. Nicklas W, Baneux P, Boot R, et al (2002) Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 36:20–42. <https://doi.org/10.1258/0023677021911740>
24. Bizzini A, Greub G (2010) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect* 16:1614–1619. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03311.x>
25. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M (2005) Model organisms: Animal models of sepsis: Setting the stage. *Nat Rev Drug Discov* 4:854–865. <https://doi.org/10.1038/nrd1854>
26. Acred P, Hennessey TD, Macarthur-Clark JA, et al (1994) Guidelines for the welfare of animals in rodent protection tests: A Report from the Rodent Protection Test Working Party. *Lab Anim* 28:13–18. <https://doi.org/10.1258/002367794781065870>
27. Uzunköy A, Özardali I, Çellik H, Demirci M (2012) Karbondioksit pnömoperitonyumun peritonitin şiddeti üzerine etkisi. *Ulus Travma ve Acil Cerrahi Derg* 18:99–104. <https://doi.org/10.5505/tjtes.2012.53503>
28. Pratt C, Campbell MD (2019) The Effect of *Bifidobacterium* on Reducing Symptomatic Abdominal Pain in Patients with Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review. *Probiotics Antimicrob Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09609-7>
29. Román L, Acosta F, Padilla D, et al (2015) The invitro immunomodulatory effect of extracellular

1 products (ECPs) of *Vagococcus fluvialis* L21 on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)
2 leucocytes. *Fish Shellfish Immunol* 42:517–521. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.11.037>

- 3 30. Gao C, Ganesh BP, Shi Z, et al (2017) Gut Microbe–Mediated Suppression of Inflammation-
4 Associated Colon Carcinogenesis by Luminal Histamine Production. *Am J Pathol* 187:2323–
5 2336. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.06.011>
- 6 31. Tena D, Fernández C, Lago MR (2015) *Alcaligenes faecalis*: An unusual cause of skin and
7 soft tissue infection. *Jpn J Infect Dis* 68:128–130. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2014.164>
- 8 32. Basharat Z, Yasmin A, He T, Tong Y (2018) Genome sequencing and analysis of *Alcaligenes*
9 *faecalis* subsp. *phenolicus* MB207. *Sci Rep* 8:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21919-4>
- 10 33. Aisenberg G, Rolston K V., Safdar A (2004) Bacteremia caused by *Achromobacter* and
11 *Alcaligenes* species in 46 patients with cancer (1989-2003). *Cancer* 101:2134–2140.
12 <https://doi.org/10.1002/cncr.20604>
- 13 34. Kavuncuoglu F, Unal A, Oguzhan N, et al (2010) First reported case of *Alcaligenes faecalis*
14 peritonitis. *Perit Dial Int* 30:118–119. <https://doi.org/10.3747/pdi.2009.00058>
- 15 35. Milanowski J, Dutkiewicz J, Potoczna H, et al (1998) Allergic alveolitis among agricultural
16 workers in eastern Poland: a study of twenty cases. *Ann Agric Environ Med* 5:31–43
- 17 36. Huang H, Lin Z, Zeng Y, et al (2019) Probiotic and glutamine treatments attenuate alcoholic
18 liver disease in a rat model. *Exp Ther Med* 4733–4739. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8123>
- 19 37. Neag MA, Catinean A, Muntean DM, et al (2020) Probiotic bacillus spores protect against
20 acetaminophen induced acute liver injury in rats. *Nutrients* 12:1–16.
21 <https://doi.org/10.3390/nu12030632>
- 22 38. Kobylak N, Abenavoli L, Mykhalchyshyn G, et al (2018) A multi-strain probiotic reduces the
23 fatty liver index, cytokines and aminotransferase levels in NAFLD patients: Evidence from a
24 randomized clinical trial. *J Gastrointest Liver Dis* 27:41–49.
25 <https://doi.org/10.15403/jgld.2014.1121.271.kby>
- 26 39. Ooi LG, Liong MT (2010) Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: A review of
27 in Vivo and in Vitro Findings. *Int J Mol Sci* 11:2499–2522. <https://doi.org/10.3390/ijms11062499>
- 28 40. Martorell P, Llopis S, González N, et al (2016) Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp.
29 *lactis* CECT 8145 Reduces Fat Content and Modulates Lipid Metabolism and Antioxidant
30 Response in *Caenorhabditis elegans*. *J Agric Food Chem* 64:3462–3472.
31 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05934>
- 32 41. Dehkohne A, Jafari P, Fahimi H (2019) Effects of probiotic *Lactobacillus paracasei* TD3 on
33 moderation of cholesterol biosynthesis pathway in rats. *Iran J Basic Med Sci* 22:1004–1009.
34 <https://doi.org/10.22038/ijbms.2019.33933.8073>
- 35 42. Julián-Jiménez A, Candel FJ, González-Del Castillo J (2017) Usefulness of biomarkers to
36 predict bacteremia in patients with infection in the emergency department. *Rev. Esp.*
37 *Quimioter.* 30:245–256
- 38 43. Liu Q, Ni X, Wang Q, et al (2017) *Lactobacillus plantarum* BSGP201683 Isolated from giant
39 panda feces attenuated inflammation and improved gut microflora in mice challenged with
40 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 8:1–12.
41 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01885>
- 42 44. Wu XZ, Wen ZG, Hua JL (2019) Effects of dietary inclusion of *Lactobacillus* and inulin on
43 growth performance, gut microbiota, nutrient utilization, and immune parameters in broilers.
44 *Poult Sci* 98:4656–4663. <https://doi.org/10.3382/ps/pez166>
- 45 45. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al (2008) *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-
46 inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease
47 patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16731–16736.
48 <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
46. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al (2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139:485–498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>
 47. van der Poll T, Marchant A, Buurman WA, et al (1995) Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J Immunol* 155:5397–401
 48. Giannini EG, Testa R, Savarino V (2005) Liver enzyme alteration: A guide for clinicians. *Cmaj* 172:367–379. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1040752>
 49. Lee MJ, Kim K, Jo YH, et al (2016) Dose-dependent mortality and organ injury in a cecal slurry peritonitis model. *J Surg Res* 206:427–434. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.08.054>
 50. Martín R, Chain F, Miquel S, et al (2017) Using murine colitis models to analyze probiotics-host interactions. *FEMS Microbiol Rev* 41:S49–S70. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux035>
 51. Kankkunen P, Teirilä L, Rintahaka J, et al (2010) (1,3)- β -Glucans Activate Both Dectin-1 and NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages. *J Immunol* 184:6335–6342. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903019>
 52. Kawashima S, Hirose K, Iwata A, et al (2012) β -Glucan Curdlan Induces IL-10–Producing CD4 + T Cells and Inhibits Allergic Airway Inflammation . *J Immunol* 189:5713–5721. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201521>

FIGURES AND TABLES (Title/Caption/Footnote)

Table 1 Scoring of rodent protection test.

Source: Adapted from Acred P. et al [26]

Table 2 Histopathology scoring of peritonitis

Source: Adapted from Uzunköy A. et al [27]

Table 3 Hematological parameters at different times post administration of *A. faecalis* A12C

RBC Total number of erythrocytes, *HGB* Hemoglobin concentration, *HCT* Hematocrit value: erythrocyte ratio of total blood volume, *PLT* Total number of platelets, *WBC* Total number of leukocytes, *S%* Segmented Neutrophil percent, *Mo%* Monocyte percent, *E%* Eosinophil percent, *B%* Basophil percent, *Le%* Lymphocyte percent. The results are expressed as the median (P25-P75) from rats without *A. faecalis* A12C administration (HC, n=15) or 7 days (HA7, n=5), 15 days (HA15, n=5) and 30 days (HA30, n=5) post administration of *A. faecalis* A12C during a week,

** P < 0.01 versus HA7.

Table 4 Serum biochemical parameters at different times post administration of *A. faecalis* A12C

ASTL Aspartate Aminotransferase, *ALT* Alanine Aminotransferase, *UREA* Urea, *CREA* Creatinine, *TBIL* Total Bilirubin, *CRP* C Reactive Protein. The results are expressed as the median (P25-P75) from rats without *A. faecalis* A12C administration (HC, n= 15) or 7 days (HA7, n=5), 15 days (HA15, n=5) and 30 days (HA30, n=5) post administration of *A. faecalis* A12C during a week.

* P < 0.05 versus HC, ** P < 0.01 versus HA7, # P < 0.02 versus HA7.

1 **Fig. 1** Experimental design and timeline. HC7, HC15 and HC30 Healthy control groups assessed at
2 7days, 15 days and 30 days respectively. HA7, HA15 and HA30 groups treated with *A. faecalis* A12C
3 and assessed at 7days, 15 days and 30 days after the first dose of probiotics. IC Infected Control
4 Group, IA Group treated with *A. faecalis* A12C and infected. Black tip arrow extra orogastric
5 administration of water or *A. faecalis* A12C suspension. E Euthanatized.
6

7 **Fig.2** Faeces concentration of *E. coli* and *A. faecalis* A12C at different times in groups treated with *A.*
8 *faecalis* A12C and assessed at *0d*, 0 days (just before administration of *A. faecalis* A12C) and *7d*
9 7days, *15d* 15 days and *30d* 30 days, after the first dose of probiotic. Box and whisker diagrams depict
10 the smallest observation, lower quartile, median, upper quartile and largest observation.
11

12 * P < 0.003, ** P< 0.0005.
13

14 **Fig. 3** Loss of bodyweight, expressed as difference in grams between weight just in the moment of *E.*
15 *coli* inoculation (7 days), and at euthanatized time(15 days) (A), or as percentage of grams lost during
16 the same period of time (B)
17

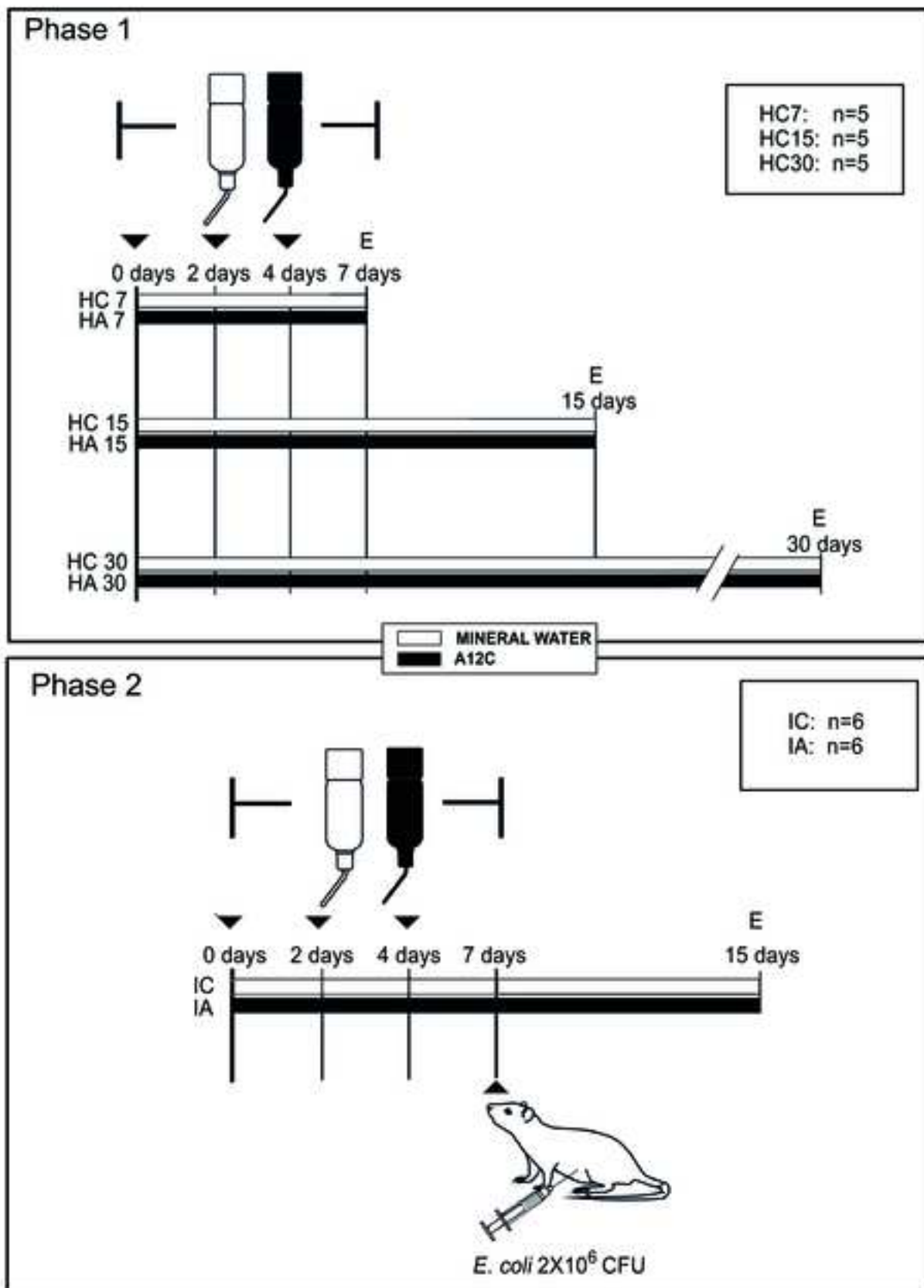
18 *IC* Infected control group, *IA* Infected group pretreated with *A. faecalis* A12C
19

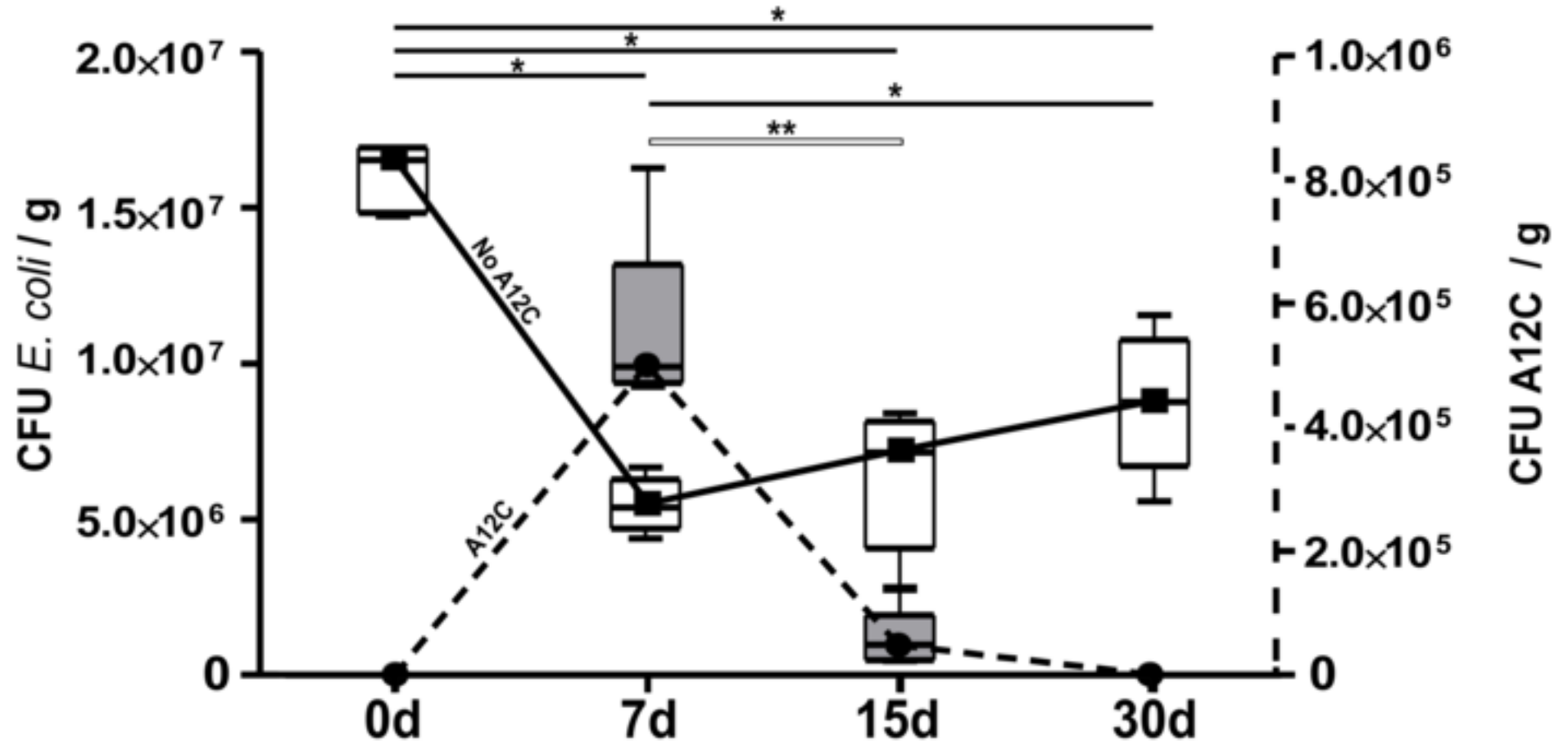
20 Box and whisker diagrams depict the smallest observation, lower quartile, median, upper quartile and
21 largest observation.
22

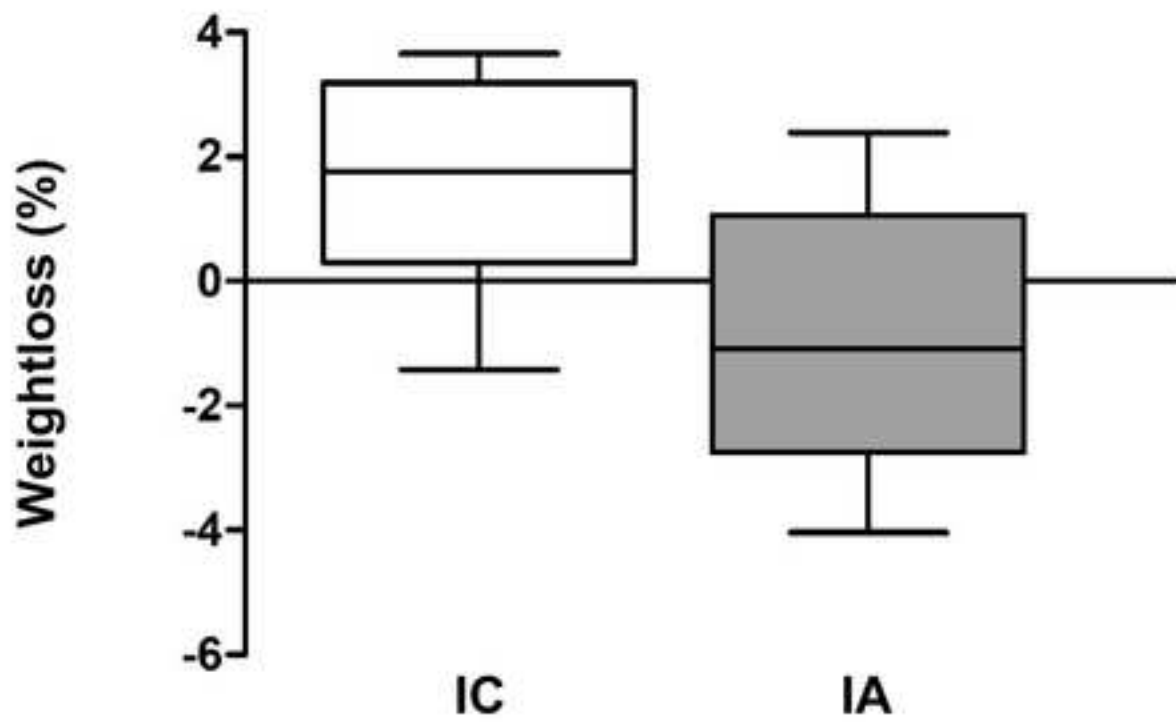
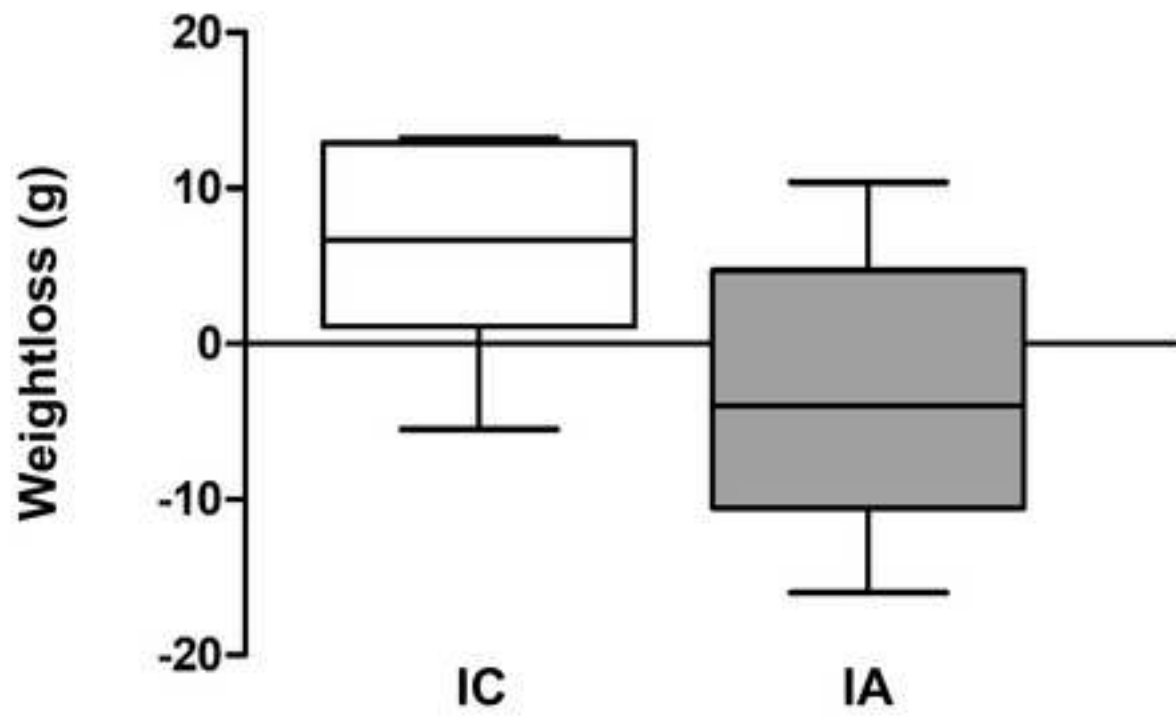
23 **Fig. 4** Percentage of Eosinophils and serum levels of Urea, ALTL (Alanine Aminotransferase) and
24 CRP (C Reactive Protein), in Infected Control Group (IC) and Infected group pretreated with *A.*
25 *faecalis* A12C (IA).
26

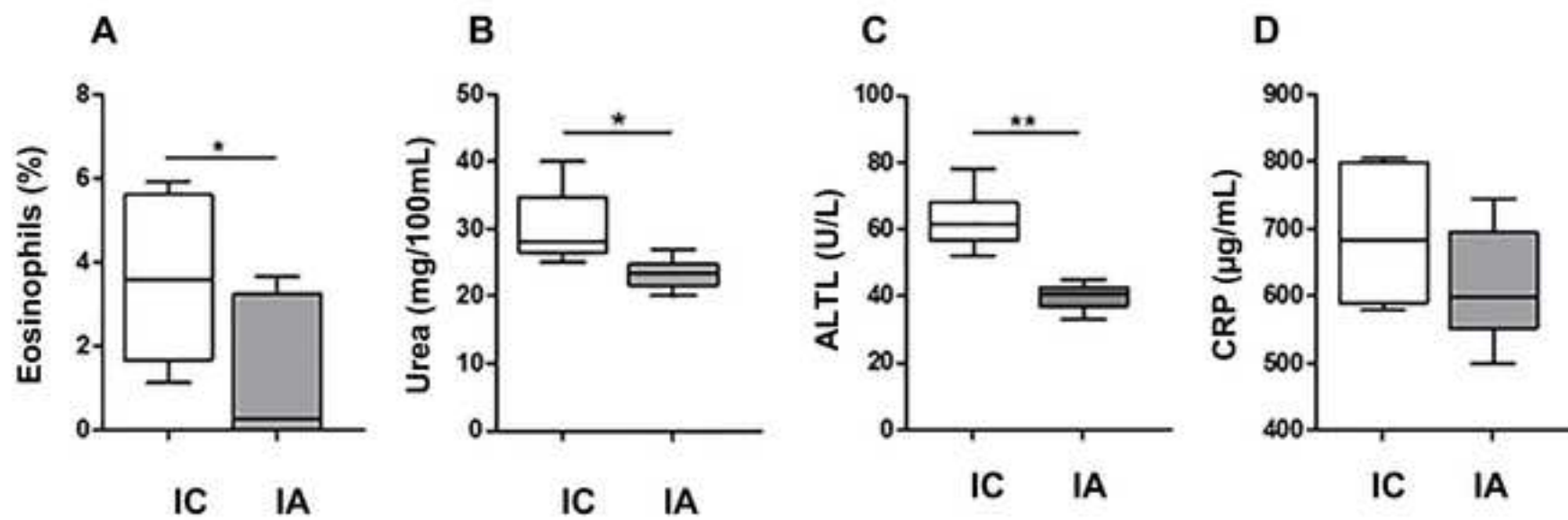
27 ** P < 0.01, * P< 0.05.
28

29 **Fig. 5** Representative histological images of hematoxilin and eosin stained sections of jejuna
30 peritoneum (A, B), mesenteric lymph nodes (C, D) and splenic hilum (E, F). Dulling of the peritoneal
31 surface, and swelling of mesothelial cell (black arrow) in jejunal peritoneum (A) and splenic hilum
32 peritoneum (E), plus focal desquamation of mesothelial cells (white arrow) in splenic hilum
33 peritoneum (E). Mixed polymorphonuclear infiltrate (black arrow) in mesenteric lymphnodes (C), in a
34 rat from IC group. No sign of inflammation or tissue alteration (red arrow) in peritoneal surface of
35 jejunal peritoneum (B), neither mesenteric lymph nodes (D) nor splenic hilum (F) in a rat from IA
36 group. 200X magnification (A, B, C, D and E); 40X magnification (F).
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65









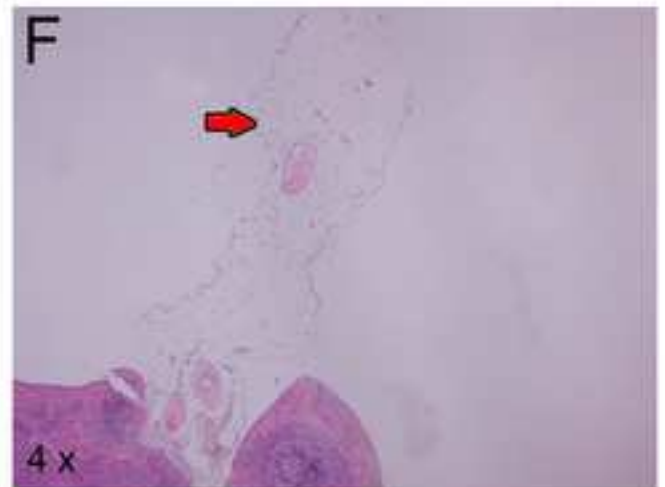
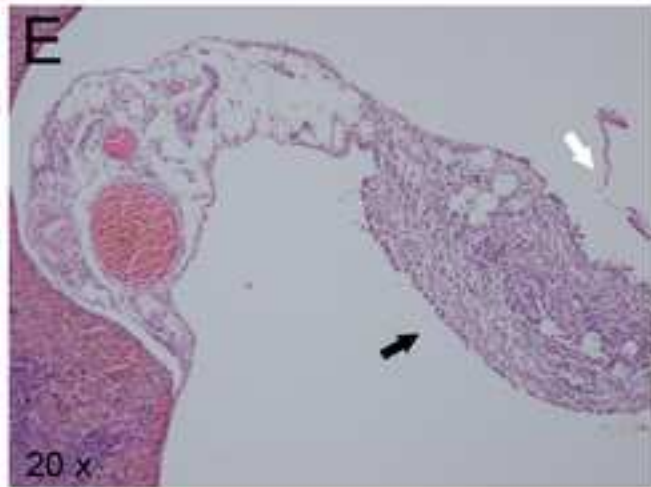
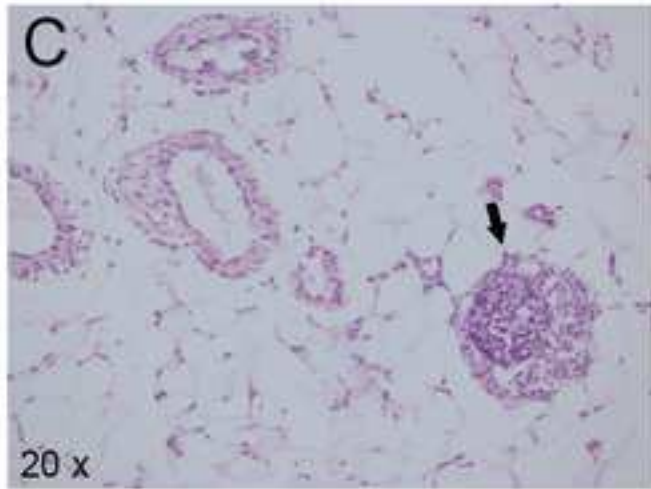
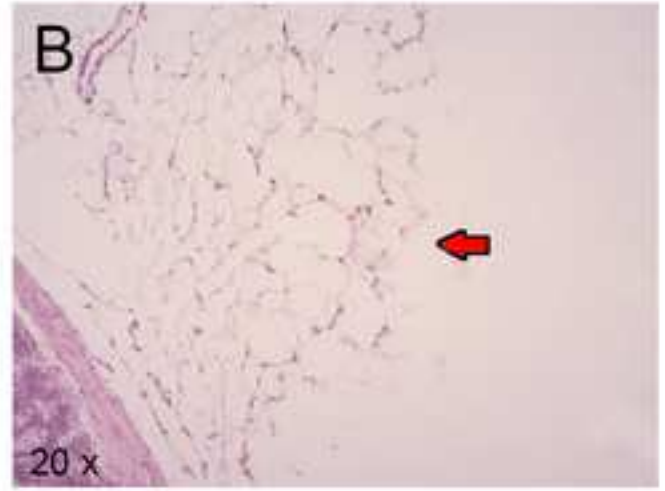
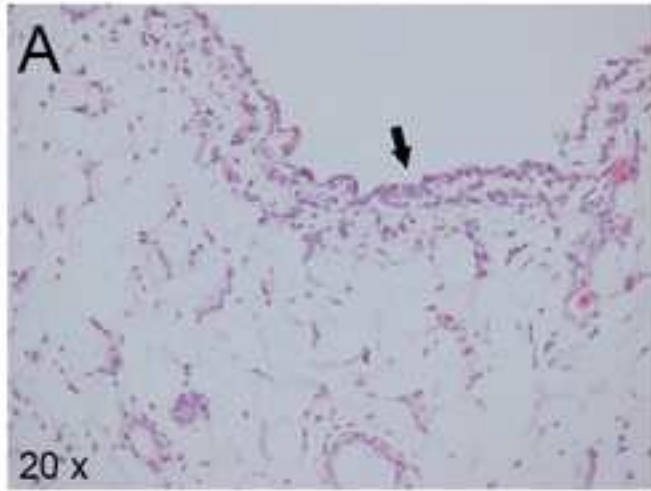


Table 1

Scoring of rodent protection test.

Vital signs	
1. Ruffled fur	6. Ataxia
2. Weight loss	7. Tremor
3. Ocular discharge	8. Hypothermia
4. Lethargy	9. Cyanosis
5. Hunched posture	
Conditions	Suggested action
5 + 6 (or 7 or 8 or 9)	Euthanasia

Source: Adapted from Acred P. et al [30]

Table 2 Histopathology scoring of peritonitis

Score Peritonitis	Scoring criteria of histopathologic findings
0	No sign of inflammation or tissue alteration
1	Dilatation of subserosal capillaries, dulling of the peritoneal surface, and swelling of mesothelial cell
2	Thin exudative fibrin film and focal desquamation of mesothelial cells, less than 10 leukocytes per 60X field
3	Extensive fibrin exudation and diffuse desquamation of mesothelial cells, greater than 10 leukocytes per 60X field or focal microabscesses

Source: Adapted from Uzunköy A. et al [29]

Table 3 Hematological parameters at different times post administration of *A. faecalis* A12C

	HC	HA7	HA15	HA30
RBC (x10⁶/μl)	10.2 (9.8-10.6)	10.2 (10.2-10.3)	10.1 (10-10.1)	9.3 (8.81-10.1)
HGB (g/dl)	17.2 (16.8-17.7)	16.7 (16-17)	16.5 (16.1-17.3)	15.7 (15.3-17.5)
HCT (%)	53.4 (51.97-54.42)	52.1 (48.1-52.1)	52.9 (52.7-52.9)	48.9 (47-54.5)
PLT (x10³/μl)	1011 (894-1030.25)	925 (904-944)	1039 (991-1076)	1011 (1005-1063)
WBC (x10³/μl)	7.91 (7.17-9.17)	8.83 (7.65-9.29)	8.1 (7.57-8.66)	7.21 (6.98 – 7.54)
S (%)	18 (14.7-21.18)	17.1 (16.2-18.5)	15.7 (11.8-16.5)	18.8 (17.6 – 19.1)
Me (%)	0.83 (0.62-1.46)	0.72 (0.56-2.09)	0.86 (0.55-1.02)	0.52 (0.48-0.75)
E (%)	0.32 (0-0.91)	1.5 (1.45-1.82)	0 (0-0.21)	0 (0-0)**
B (%)	1.41 (0.79-2.36)	0.85 (0.5-1.52)	2.3 (1.91-2.87)	0.94 (0.76-1.09)
Le (%)	42 (37.68-44.47)	43.5 (43-47.1)	44.1 (41.4-45.3)	49.5 (45.9-52.4)

RBC Total number of erythrocytes, *HGB* Hemoglobin concentration, *HCT* Hematocrit value: erythrocyte ratio of total blood volume, *PLT* Total number of platelets, *WBC* Total number of leukocytes, *S%* Segmented Neutrophil percent, *Me%* Monocyte percent, *E%* Eosinophil percent, *B%* Basophil percent, *Le%* Lymphocyte percent. The results are expressed as the median (P25-P75) from rats without *A. faecalis* A12C administration (HC, n= 15) or 7 days (HA7, n=5), 15 days (HA15, n=5) and 30 days (HA30, n=5) post administration of *A. faecalis* A12C during a week,

** P < 0.01 versus HA7 by Mann- Whitney *U* test.

Table 4 Serum biochemical parameters at different times post administration of *A. faecalis* A12C

	HC	HA7	HA15	HA30
ASTL (IU/l)	128.5 (120.25-141.25)	86* (82-88)	92# (87-93)	150** (146-156)
ALTL (IU/l)	42 (38.25-44.75)	38 (34-40)	35 (34-36)	33 (33-40)
UREA (mg/dl)	29 (28-31)	29 (27-31)	30 (29-30)	28 (28-29)
CREA (mg/dl)	0.3 (0.29-0.33)	0.35 (0.33-0.35)	0.31 (0.31-0.32)	0.27# (0.27-0.28)
TBIL(mg/dl)	0.7 (0.7-0.8)	0.8 (0.7-0.8)	0.8 (0.8-0.9)	0.5 (0.5-0.7)
CRP (µg/ml)	418.45 (346.27-504.08)	315.81 (278.21-333.21)	410.99 (355.96-24.18)	396.08 (343.83-469.65)

ASTL Aspartate Aminotransferase, *ALTL* Alanine Aminotransferase, *UREA* Urea, *CREA* Creatinine, *TBIL* Total Bilirubin, *CRP* C Reactive Protein. The results are expressed as the median (P25-P75) from rats without *A. faecalis* A12C administration (HC, n= 15) or 7 days (HA7, n=5), 15 days (HA15, n=5) and 30 days (HA30, n=5) post administration of *A. faecalis* A12C during a week.

* P< 0.05 versus HC, ** P < 0.01 versus HA7, # P< 0.02 versus HA7

TESIS DOCTORAL

Ana Isabel Gutiérrez Falcón

**NUEVAS CEPAS PROBIÓTICAS
PARA ACUICULTURA**

DOCTORADO EN SANIDAD ANIMAL Y
SEGURIDAD ALIMENTARIA

Arucas, 2021



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Instituto Universitario de Sanidad Animal
y Seguridad Alimentaria