

**CARACTERIZACIÓN de CEPAS
BACTERIANAS con PROPIEDADES
ANTIMICROBIANAS y de sus FAGOS,
AISLADAS en INSTALACIONES de
ACUICULTURA**

TESIS DOCTORAL

José Ramos Vivas

Enero 2023

**Tesis Doctoral presentada en la Universidad de
Las Palmas de Gran Canaria para optar al
grado de Doctor**

**Programa de Doctorado en Acuicultura
Sostenible y Ecosistemas Marinos por la
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria**

**Línea de Investigación: SALUD Y
BIENESTAR DE ANIMALES ACUÁTICOS**

Resumen

Una limitación importante para la producción acuícola sostenible es la aparición de enfermedades infecciosas, especialmente las causadas por bacterias y virus. Para prevenir y combatir las enfermedades infecciosas causadas por bacterias en peces y moluscos se utilizan principalmente los antibióticos. Pero dado que el mal uso y el abuso de los antibióticos conducen a la generación de resistencia en las bacterias, su utilización cada vez está más desaconsejada, llegando a prohibirse su utilización en varios países con importantes producciones en el sector de la acuicultura.

Nuestra hipótesis de partida es que las instalaciones donde se cultivan peces y moluscos pueden también ser una fuente notable de bacterias con capacidad probiótica o de interés biotecnológico. Partiendo de la base de la gran diversidad bacteriana que hay en estos ambientes, en primer lugar hemos realizado una búsqueda de bacterias en distintas zonas del Instituto ECOAQUA de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria con las que hemos realizado una serie de ensayos de antagonismo frente a distintas cepas de patógenos de peces de interés en acuicultura: *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Streptococcus iniae*. Hemos utilizado también estas bacterias para realizar ensayos de inhibición de quorum-sensing frente a una cepa de *Chromobacterium violaceum* productora de violaceína.

De las 276 cepas inicialmente aisladas, hemos detectado que algunas de ellas tienen gran capacidad para inhibir distintas especies de patógenos e incluso inhibir la producción de violaceína en la cepa reportera. Hemos cuantificado su adherencia mediante ensayos de formación de biofilms y hemos secuenciado algunas de ellas. Siete de las 8 bacterias secuenciadas no presentan genes importantes de virulencia o de resistencia a los antibióticos, por lo que estas cepas bacterias podrían mostrar un buen perfil para su utilización como probióticos, al competir directamente contra patógenos que pueden atacar cultivos de peces y moluscos.

Por otro lado, hemos seleccionado una parte de estas cepas para estudiar la inducción de fagos mediante Mitomicina C. Los ensayos de inducción con este compuesto han mostrado que aproximadamente el 50% de las cepas aisladas en instalaciones de acuicultura portan posibles fagos. Creemos que conocer las bacterias autóctonas que conviven con los peces en las piscifactorías, así como sus fagos, podrá ayudarnos a implementar medidas para favorecer la presencia de bacterias probióticas y perjudicar la presencia de bacterias patógenas. En esta tesis doctoral hemos implementado técnicas para continuar en ese camino.

Abstract

A major constraint to sustainable aquaculture production is the emergence of infectious diseases, especially those caused by bacteria and viruses. To prevent and combat infectious diseases caused by bacteria in fish and mollusks, antibiotics are mainly used. But given that the misuse and abuse of antibiotics lead to the generation of antimicrobial resistance in bacteria, their use is increasingly discouraged, and even banned in several countries with important productions in the aquaculture sector. We need viable alternatives to antibiotic use. Our starting hypothesis is that facilities where fish and mollusks are farmed may also be a notable source of bacteria with probiotic capacity or biotechnological interest. Based on the great bacterial diversity that exists in these environments, we have first carried out a search for bacteria in different areas of the ECOAQUA Institute of the University of Las Palmas de Gran Canaria with which we have carried out a series of antagonism tests against different strains of fish pathogens of interest in aquaculture: *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Streptococcus iniae*.

We have also used these bacteria to perform quorum-sensing inhibition tests against a violacein-producing strain of *Chromobacterium violaceum*.

Of the 276 strains initially isolated, we have detected that some of them have great capacity to inhibit different species of pathogens and even inhibit the production of violacein in the reporter strain. We have quantified its adherence through biofilm formation assays and sequenced some of them. Seven of the 8 bacteria sequenced do not have important virulence or antibiotic resistance genes, so these bacterial strains could show a good profile for use as probiotics, by competing directly against pathogens that can attack fish and mollusks. On the other hand, we have selected a part of these strains to study the induction of phages by Mitomycin C. Induction tests with this compound have shown that approximately 50% of strains isolated in aquaculture facilities carry potential phages. We believe that knowing the native bacteria that live with fish in fish farms, as well as their phages, can help us implement measures to favor the presence of probiotic bacteria and harm the presence of pathogenic bacteria. In this doctoral thesis we have implemented techniques to continue on that path.

Agradecimientos

A mi Director, el Dr. Félix Acosta, por confiar en que esto podía salir adelante a pesar de las dificultades que han surgido en el camino. Muchas gracias por invitarme a esta isla y por todo lo que hemos compartido en ella, sobre todo las conversaciones sobre ciencia, aderezadas con veladas al calor de la gastronomía Canaria.

El instituto ECOAQUA y al grupo de Investigación en acuicultura, en especialmente a los técnicos de laboratorio por facilitar nuestros experimentos en las instalaciones de Taliarte.

También quiero agradecer al Dr. Daniel Montero su paciencia y comprensión, y su apoyo durante la realización de los cursos de doctorado y durante la presentación de informes. Espero que podamos hacer muchas fotografías juntos.

Gracias a todos mis amigos y colaboradores científicos: a todos mis excompañeros del Instituto IDIVAL y de la Universidad Europea del Atlántico, así como al Dr. Nelson Pérez Guerra por su apoyo en la Universidad de Vigo, Universidad donde nací científicamente hace ya unos años.

Al Dr. Fidel Madrazo por su inestimable ayuda con el microscopio electrónico de transmisión.

A Marta por su ayuda con la secuenciación, esperamos poder publicar pronto estos resultados.

A Santi Redondo Salvo, por su ayuda con el análisis de secuencias genomas.

A todos los revisores de nuestros artículos, por sus comentarios, siempre constructivos.

A mis padres y hermanos, por su apoyo incansable en la distancia.

Abreviaturas

µm: micrómetros

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

APROMAR: Asociación empresarial de acuicultura española

ARN: Ácido Ribonucleico

BHIB: Brain Heart Infusion Broth (Caldo Infusión de Cerebro y Corazón)

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CV: Cristal Violeta

DCD: Charge Coupled Device (Dispositivo de Carga Acoplada).

DS: Desviación estándar

dsDNA: ADN de doble cadena.

EFSA: European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos

GC: Contenido en GC (%) del genoma

GRAS: General Recognized As Safe (Reconocidos Generalmente como Seguros)

LB. Luria Broth (Caldo Luria).

mL: mililitros

mm: milímetros

n.d.: no determinado

NGS: Next Generation Sequencing (secuenciación masiva).

PHASTER (PHAge Search Tool - Enhanced Release)

QQ: Quorum Quenching

QS: Quorum-Sensing

RAST: Rapid Annotation using Subsystem Technology (Tecnología Rápida de Anotación de Subsistemas).

TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión

TSB: Tryptic Soy Broth (Caldo de Soja y Tripticasa)

A mi mujer Patricia, y a mis hijos Alejandra y Julio.

Índice

	Pag.
Resumen	i
Abstract	ii
Agradecimientos	iii
Lista de abreviaturas	vi
Introducción	1
Antibióticos en acuicultura	4
Perspectiva ONE HEALTH	6
Estrategias para reducir el uso de antibióticos en acuicultura	7
Probióticos en acuicultura	8
Antagonismo bacteriano	9
Bacteriófagos	11
Biología de los bacteriófagos	13
Distribución de los bacteriófagos	13
Ciclo de vida de los bacteriófagos	14
Enzimas líticas de fagos y despolimerasas	17
Taxonomía	18
Inducción del ciclo lítico/lisogénico de bacteriófagos	20
Objetivos	28
Materiales y Métodos	30
Cepas bacterianas y cepas tipo utilizadas	31
Medios de cultivo microbiológicos utilizados	32
Aislamiento de bacterias en instalaciones de acuicultura	33

Test de antagonismo frente a patógenos de interés en acuicultura	34
Ensayo de formación de biocapas o biofilms	35
Ensayos de inhibición de Quorum-Sensing	36
Experimentos de inducción de fagos con Mitomicina C	36
Secuenciación de cepas con propiedades inhibitorias de patógenos de peces	37
Fotografía y Microscopía Electrónica de Transmisión	39
Resultados	41
Aislamiento de bacterias en las instalaciones de ECOAQUA	41
Estudios de antagonismo frente a patógenos de peces Gram positivos y Gram negativos	43
Estudios de antagonismo frente a <i>C. violaceum</i>	63
Formación de Biofilms	76
Experimentos de inducción de fagos con Mitomicina C	74
Secuenciación de genomas completos	91
Microscopía Electrónica de Transmisión TEM	105
Discusión	109
Búsqueda de bacterias en instalaciones de acuicultura	109
Ensayos de antagonismo bacteriano	111
Posible utilización como probióticos de algunas de las cepas caracterizadas	113
QUORUM SENSING	115
Adherencia de las cepas aisladas en instalaciones de acuicultura	117
Presencia potencial de fagos en bacterias presentes en instalaciones de acuicultura	118
Conclusiones	122
Bibliografía	124
Anexos I-VIII Genomas bacterianos secuenciados (pendrive)	163

Introducción

Introducción

La creciente demanda de alimentos en el mundo hace que crezcan fuertemente los estímulos a la intensificación de la producción de animales destinados al consumo humano, generando la necesidad de prácticas económicamente viables y ambientalmente sostenibles, que puedan depender de mejores estrategias de gestión de la salud de dichos animales. La producción de alimentos segura y sostenible en todos los sectores es una prioridad para Naciones Unidas, que la ha situado como uno de los objetivos centrales de la “Agenda de los Objetivos de Desarrollo Sostenible 2030”. Según esta agenda, el aumento de la producción debe ir acompañado de buenas prácticas que reduzcan un posible impacto negativo sobre nuestro planeta.

Dentro de la producción de alimentos, la acuicultura juega un papel fundamental, representando una contribución significativa al suplemento proteico de los seres humanos, y por ello ha sido reconocida como un sector estratégico y crucial. Por supuesto, también representa la forma más realista de incrementar el volumen de pescado y marisco, si queremos reducir por otro lado el volumen de pescado que arranca del mar la pesca extractiva. Además, en algunos países en desarrollo, la acuicultura representa uno de los apoyos más valiosos a la hora de proporcionar alimento a millones de personas con recursos limitados. En este sector, también se viene demandando un incremento de las buenas prácticas de cultivo que reduzcan el impacto negativo sobre los ecosistemas acuáticos, pues, según algunas previsiones del Banco Mundial, en solo una década algunos sectores de la acuicultura podrían superar el 60% de crecimiento. Este crecimiento debería ir por lo tanto acompañado de una mejora en las prácticas de cultivo. En España, el sector de la acuicultura se centra principalmente en la producción de lubina (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Sparus aurata*), rodaballo (*Psetta máxima*) y corbina (*Argyrosomus regius*), siendo las principales regiones productoras Murcia, Andalucía, Valencia, Cataluña y las Islas Canarias (Informe APROMAR 2022 <https://apromar.es/informes/>).

Una limitación importante para la producción acuícola sostenible y la economía que subyace a esta práctica a nivel global, es la aparición de enfermedades infecciosas, especialmente las causadas por bacterias y virus (Lafferty et al., 2015; Kibenge, 2019; Krkosek et al., 2006; Stentiford et al., 2012. Para prevenir y combatir las enfermedades

infecciosas causadas por bacterias en peces y moluscos se utilizan principalmente los antibióticos. El uso de antibióticos en la acuicultura es un recurso habitual para reducir las enfermedades infecciosas y promover el crecimiento de los peces, pero, dado que los antibióticos conducen a la generación de resistencia en las bacterias, su uso cada vez está más desaconsejado, llegando a prohibirse su utilización en varios países con importantes producciones en el sector de la acuicultura.

La utilización masiva de antibióticos en medios acuáticos presenta varios problemas que tienen difícil solución si no se controla rigurosamente. Uno de estos problemas es lo que podríamos denominar “factor de dilución” de los ecosistemas acuáticos. Cuando las concentraciones profilácticas o terapéuticas de antibióticos utilizados para tratar a los peces se diluyen en los ambientes acuáticos, alcanzan rápidamente concentraciones subterapéuticas, término que si lo correlacionamos con las observaciones en el laboratorio podríamos denominarlas “subinhibitorias”. Estas concentraciones subterapéuticas y por lo tanto subinhibitorias, aumentan la presión selectiva sobre las bacterias. Esto es fácil de demostrar en el laboratorio pero difícil de comprobar en un ecosistema acuático abierto. Cuando enfrentamos a las bacterias a concentraciones subinhibitorias en el laboratorio, el fenotipo de éstas cambia, en general, resistiendo fácilmente a dichas concentraciones, lo que a su vez favorece la aparición de fenotipos que antes no existían. Esto es una consecuencia directa de un cambio global de la expresión de genes implicados en diferentes aspectos, desde la morfología bacteriana hasta la expresión de estructuras relacionadas con la adherencia y la formación de biocapas o “biofilms” (Braga et al., 1997; Lázaro-Díez et al., 2016). Estos cambios terminan por hacer resistentes a las bacterias a concentraciones mayores de antibióticos (ya sea por la sobreexpresión de bombas de expulsión en la membrana, la formación de biofilms, etc.), con el consiguiente estímulo a la transferencia de genes de resistencia a otras bacterias presentes en el medio acuático. Además, existen también mecanismos de co-selección o de co-resistencia, donde una bacteria que se hace resistente a un antibiótico, puede terminar expresando también resistencia a otros antibióticos de naturaleza o estructura molecular similar -por ejemplo, mediante la adquisición de mutaciones en diferentes *loci* genéticos que afectan a diferentes antimicrobianos- (Baker-Austin et al., 2006; Christaki et al., 2020).

En la actualidad, está ampliamente documentado que las bacterias resistentes y los genes de resistencia a los antibióticos se transportan del medio acuático al medio terrestre y pueden tener efectos adversos para la salud humana y animal. Así, por ejemplo, la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) está aplicando una regulación

estricta del uso de antibióticos con vistas a asegurar que se utilicen de una forma responsable en las instalaciones de acuicultura. Además, ha señalado claramente aquellas especies de peces donde deben ser utilizados, y cuáles son las variables a tener en cuenta respecto a la duración de los tratamientos, de manera que estos medicamentos se utilicen de la forma más eficaz posible. Para que todo esto de resultado, se ha aumentado el control sobre las prescripciones con fines terapéuticos, se ha vetado el empleo de antibióticos que puedan ser utilizados también en medicina humana y se ha planificado un control más estricto sobre la utilización de antibióticos con fines profilácticos.

Antibióticos en acuicultura

El descubrimiento, la producción en masa y la utilización de los antibióticos para combatir las enfermedades infecciosas causadas por bacterias ha sido uno de los logros más importantes de la historia de la humanidad, junto, posiblemente, con las vacunas y la potabilización del agua para consumo humano. El término antibiótico parece que fue acuñado por primera vez en EE. UU. por el microbiólogo Selman A. Waksman (1888-1973) para describir sustancias químicas producidas por microorganismos que tenían efectos antagonistas sobre el crecimiento de otros microorganismos (compuestos que producían algunas bacterias para matar a otras bacterias). Como él mismo cuenta en su artículo, en español: “*¿Qué es un antibiótico o una sustancia antibiótica?*”, publicado en la revista *Mycologia* en 1947 (Waksman, 1947), fue el editor de la revista *Biological Abstracts* (Dr. A. Flynn) el que le pidió en julio de 1941 que buscara un nombre para describir esas sustancias. Waksman, basándose en la escasa literatura existente y en el término antibiosis -acuñado por el biólogo francés Paul Vuillemin en un artículo publicado en la revista de la Asociación Francesa para el Avance de la Ciencia en 1889- propuso específicamente el nombre de antibiótico porque, primero, se había utilizado muy escasamente antes de 1941 y segundo, su utilización en esas contadas ocasiones era muy confusa, por lo que él quiso verter un poco de luz sobre el asunto.

Los antibióticos han salvado millones de vidas humanas en los últimos setenta y cinco años, y han contribuido al arsenal terapéutico para mejorar los sistemas de producción de animales en ganadería y acuicultura. En la actualidad, han perdido buena parte de su poder, debido notablemente a que muchas bacterias se han hecho insensibles a ellos. El

aumento del número de estas bacterias insensibles -o lo que es lo mismo, resistentes- a los antibióticos, es hoy en día un problema muy preocupante. Además, tenemos el fenómeno de la aparición de las denominadas “superbacterias” resistentes a múltiples antibióticos (Lammie and Hughes, 2016; Trossman, 2014; Gray and Wenzel, 2020).

En el caso de la acuicultura, algunas regiones del mundo ya son consideradas como “puntos calientes” de generación de bacterias resistentes; notablemente regiones de Asia (Nhung et al., 2016; Cabello et al., 2016; Schar et al., 2021). En otros lugares, como por ejemplo en Chile, donde el cultivo de salmón ha incrementado notablemente la utilización de antibióticos, no existen estudios suficientes que puedan dar un enfoque realista sobre lo que está pasando a nivel de aparición de bacterias resistentes, como podría ser caso del patógeno *Piscirickettsia salmonis* (Miranda et al., 2018). Esto se podría aplicar igualmente a otras zonas donde la acuicultura está experimentando un creciente desarrollo.

En general, aunque los patógenos que afectan a las especies de peces y moluscos son menos conocidos que los patógenos que afectan a la ganadería o a las personas, y suelen ser más susceptibles a los antibióticos que se utilizan habitualmente en ganadería y en medicina humana, cada vez más estudios demuestran que algunas de estas especies generan fácilmente resistencias a los antibióticos que se utilizan en producción acuícola. Un ejemplo claro son algunas especies de *Vibrio*, *Edwardsiella*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* (Elmahdi et al., 2016; Leung et al., 2019; Nguyen et al., 2014; Dutta et al., 2021).

Por otro lado, las comunidades bacterianas que viven en ambientes donde se crían peces y moluscos -incluidas las instalaciones en tierra- están poco estudiadas desde el punto de vista de la presencia de genes de resistencia a los antibióticos. Ya que una de las principales preocupaciones de las empresas dedicadas a la producción de peces y moluscos son los patógenos, serían necesarios más estudios que analizaran las poblaciones autóctonas de bacterias desde el punto de vista de la presencia o transmisión de genes de resistencia (Laborda et al., 2022; Bengtsson-Palme et al., 2018; Andersson and Hughes, 2017; Nnadozie and Odume, 2019). Por otro lado, también es interesante realizar más investigaciones en este campo, porque esas bacterias que viven en ambientes marinos pueden ser una fuente fiable para la detección de genes de resistencia pero también porque se podrían explorar de sus genomas con vistas al descubrimiento de nuevas actividades enzimáticas que puedan incluso llegar a combatir la resistencia de los patógenos a los antibióticos (Grady et al., 2016; Stincone and Brandelli, 2020; Dufourcq

et al., 2014; Pham et al., 2016; Gerwick and Fenner, 2013). A esto no son ajenas las industrias farmacéuticas, que se han centrado en las últimas décadas en la búsqueda de compuestos de diversa naturaleza en organismos y microorganismos que viven en ambientes acuáticos (Imhoff et al., 2011; König et al., 2006; Tanaka et al., 2022; Xiong et al., 2013).

Perspectiva ONE HEALTH

El concepto de “Una sola Salud” o “One Health “ es una estrategia colaborativa de múltiples profesiones relacionadas con las ciencias de la salud y la ecología para lograr una salud óptima para las personas, los animales domésticos y salvajes, las plantas y el medio ambiente. Ya que muchas familias de antimicrobianos utilizados para tratar infecciones bacterianas en humanos también se usan en animales, el estudio de la resistencia a estos compuestos debe incluir el uso y abuso de antibióticos en medicina humana, medicina veterinaria, agricultura y también en el medio ambiente. Pero además, debemos estudiar y comprender mejor como es el tránsito de los genes o determinantes de resistencia de a esos antibióticos en esos diferentes sectores y a escala global, por lo que parece lógico abordar el problema de la resistencia de las bacterias a los antibióticos con un enfoque global, que es lo que se pretende con One Health (McEwen and Collignon, 2018; Hernando-Amado et al., 2019; Collignon and McEwen, 2019; Escudeiro et al., 2019; Aslam et al., 2021).

Dentro de los sectores implicados en la estrategia One Health, la acuicultura debe ocupar un lugar principal. Esto es debido a que el uso de antibióticos en acuicultura contamina fácilmente los ambientes acuáticos donde se utilizan, afectando a las bacterias no solo autóctonas de las zonas donde se aplican estos tratamientos, sino también a microbiotas alejadas del punto de utilización, debido a la evidente dispersión acuática de los medicamentos (Vergis et al., 2021; Waseem et al., 2018). Si bien la probabilidad de que bacterias resistentes de ambientes acuáticos lleguen a ecosistemas terrestres y a sectores como la ganadería o incluso los ambientes hospitalarios es baja, los genes de resistencia que se generan en acuicultura sí que pueden terminar por afectar a esos otros sectores (Hossain et al., 2022; Zheng et al., 2021; Buschmann et al., 2012; Feng et al., 2022).

Al aumento de la resistencia de las bacterias a los antibióticos en el sector de la acuicultura se suma el cambio climático. El cambio climático, aunque va a afectar aperiódicamente- si no lo está haciendo ya- a los distintos ecosistemas del planeta, parece inexorable (Stevenson et al., 2015; Woodward et al., 2010). Así, los científicos nos dicen que el cambio climático afectará al comportamiento de los patógenos que atacan a la acuicultura (Pepi and Focardi, 2021). Además, recordando la rápida tasa de crecimiento de la acuicultura en los próximos años, algunos datos nos indican incluso que la utilización de antibióticos en acuicultura supera los niveles de utilización en medicina humana y veterinaria (Schar et al., 2020). Por lo tanto, el cambio climático se sumará a la presión selectiva que introducen los antibióticos en los sistemas acuáticos, lo que posiblemente va a crear un caldo de cultivo que solo se va a poder atacar desde la perspectiva One Health (Reverter et al., 2020; Larsson and Flach, 2022; Preena et al., 2020).

Una vez más, conocer la microbiota de los ambientes acuáticos no solo a escala local, sino regional, permitirá vigilar los flujos de genes de resistencia que se generen en las poblaciones de bacterias autóctonas presentes en esos ambientes, y de manera especial, las poblaciones de bacterias relacionadas con las instalaciones o lugares donde se practica la acuicultura.

Estrategias para reducir el uso de antibióticos en acuicultura

Cada vez hay una mayor preocupación por el aumento del uso de antibióticos en acuicultura y el aumento de la resistencia de las bacterias a ellos, y concomitantemente, un mayor interés por reducir la utilización de estos medicamentos mediante estrategias clásicas o más innovadoras. Debido al incremento de la resistencia de las bacterias a los antibióticos, actualmente hay tres estrategias que predominan a la hora de sustituir o ayudar a los tratamientos con antibióticos en acuicultura, con vistas a mantener o mejorar la salud de los peces. A la opción clásica de un mejor y más eficiente manejo de los cultivos de peces (Pruden et al., 2013), se unen estrategias como la vacunación (Adams, 2019; Jose Priya and Kappalli, 2022; Brudeseth et al., 2013; Mondal and Thomas, 2022; Munang'andu and Evensen, 2019), la utilización de probióticos para mejorar la salud de los peces, y la utilización de bacteriófagos. A estos dos últimos apartados dedicaremos los siguientes párrafos.

Probióticos en acuicultura

Los probióticos, se definieron inicialmente como microorganismos que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal. El término probiótico surgió de las palabras griegas "pro" y "bios" que significan "para la vida"; en otras palabras, que ayudan de forma natural a mejorar la salud general del organismo hospedador.

El concepto moderno de “probiótico” se atribuye al microbiólogo ruso Iliá Ilich Méchnikov, también conocido en Occidente como Elie Metchnikoff (1845-1916). Metchnikoff, realizó estudios basados en las observaciones de un microbiólogo búlgaro llamado Stamen Grigorov (1878-1945) sobre la bacteria que conocemos ahora como *Lactobacillus bulgaricus*, uno de los componentes vivos que podemos encontrar en el yogurt. Este investigador búlgaro había predicado los efectos beneficiosos sobre la salud de sus compatriotas. Sin embargo, el origen del “término” probiótico se atribuye a Werner Georg Kollath (1892-1970), un microbiólogo alemán que lo propuso en 1953 como -probiotika-, para designar unas “sustancias activas esenciales para el desarrollo saludable de la vida” (Lilly and Stillwell, 1965).

En acuicultura, los probióticos son bacterias -o microorganismos, ej. levaduras- vivas que introducidas en el tracto gastrointestinal de los peces a través de los alimentos o el agua promueven la buena salud de los animales, al mejorar su equilibrio microbiano interno y favorecer la homeostasis. Reid y colaboradores introdujeron un matiz a esta definición, y que está hoy ampliamente aceptado: “cuando son administrados en cantidades adecuadas y confieren un beneficio para el hospedador “ (Reid et al., 2003).

Poco más tarde, en 2005, nutricionistas de la Universidad de Turku, en Finlandia, propusieron también que los probióticos pueden ser parte de la microbiota intestinal saludable y por lo tanto, pueden ser adicionados en la dieta para restaurar una microbiota intestinal dañada, lo que se conoce como estado de disbiosis (Salminen et al., 2005) .

La utilización de probióticos es una alternativa a los antibióticos porque, al contrario que estos, no reducen las poblaciones de bacterias “buenas” de la microbiota de los peces. Además, ayudan a combatir directamente a patógenos y no suponen un problema a la hora de que puedan aparecer resistencias. Por otro lado, se presentan como una alternativa “ecológica” que no supone un problema para el ambiente. Las cepas de bacterias probióticas utilizadas en acuicultura no solo mejoran el crecimiento de los peces sino que también favorecen un mejor desarrollo del sistema inmunitario. Algunas revisiones se

han encargado de enumerar los géneros de bacterias que albergan cepas con capacidad probiótica. Así, no encontramos con que distintas cepas, principalmente de los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Vagococcus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Roseobacter* y *Shewanella* que han sido testadas con relativo éxito como probióticos en animales acuáticos (Vine et al., 2006; Ninawe and Selvin, 2009; Das et al., 2008; Kuebutornye et al., 2019; Verschuere et al., 2000; Balcázar et al., 2006; Sonnenschein et al., 2021).

Antagonismo bacteriano

Entre las características destacadas que poseen las cepas con capacidad probiótica están las de la aportación a la mejora de los procesos digestivos mediante actividades enzimáticas que pueden ser variadas, la de ser utilizadas ellas mismas como fuente de macronutrientes, la activación o mantenimiento de una respuesta inmunitaria adecuada -preferentemente anti-inflamatoria-, la producción de proteínas o péptidos inhibitorios del crecimiento de otras bacterias o que provocan directamente su muerte -notablemente, bacteriocinas-, y el antagonismo, bien sea para competir por los nutrientes, por el espacio físico o simplemente por competición por los sitios de unión dentro o en la superficie de las células del hospedador (Fonseca et al., 2021; Wang et al., 2021; Klaenhammer and Kullen, 1999; Samot et al., 2011).

Los fenómenos de antagonismo bacteriano se conocen incluso desde épocas anteriores al descubrimiento de la Penicilina por Alexander Fleming (1881-1955). Este bacteriólogo escocés, durante el discurso que ofreció al recibir el Premio Nobel, dijo lo siguiente: *“Para mi generación de bacteriólogos, la inhibición de un microbio por otro era algo común. Todos aprendimos acerca de estas inhibiciones, y de hecho rara vez un bacteriólogo clínico observador podía pasar una semana sin ver en el curso de su trabajo ordinario casos claros de antagonismo bacteriano”*.

Muchos otros científicos antes que Alexander Fleming descubrieron las propiedades antibacterianas de hongos contra las bacterias, o de bacterias contra otras bacterias, como el fisiólogo inglés John Scott Burdon-Sanderson (1828-1905), o incluso el físico irlandés John Tyndall (1820-1893). Los investigadores Rudolph Emmerich (1856-1914) y Oscar Loew (1844-1941) concentraron una sustancia que producía la bacteria *Bacillus*

pyocyaneus y que supuestamente inhibía a *V. cholerae*. La llamaron piocianasa. Por aquel entonces comenzaba a añadirse la terminación -asa a las proteínas que tenían actividad enzimática. La actividad enzimática de la piocianasa consistía literalmente en “lisar” bacterias. Esta bacteria, el *Bacillus pyocyaneus*, pasó a llamarse de varias maneras desde 1872 -cuando fue descubierta- hasta la actualidad, donde ahora la conocemos como *Pseudomonas aeruginosa*. El problema de la piocianasa fue que se mostró tóxica no solo con las bacterias sino también con los humanos, porque tenía actividad hemolítica en nuestros glóbulos rojos.

Selman A. Waksman estudió un grupo de bacterias llamadas actinomicetos durante su máster y posteriormente durante su tesis doctoral, en la Universidad de California en Berkeley. Cuando el ser humano ha imitado los compuestos producidos por los microorganismos y los ha fabricado de forma sintética en el laboratorio se denominan antimicrobianos. Utilizaré ambos términos indistintamente a lo largo de esta tesis.

Pues bien, desde los tiempos de Fleming y Waksman, los ensayos de antagonismo microbiano han sido clave para encontrar nuevos antibióticos (Imai et al., 2019; Gonzalez-Franco and Robles-Hernández, 2022; Vila et al., 2020). Además, los ensayos de antagonismo forman una parte esencial del cribado de cepas probióticas a la hora de demostrar un efecto bactericida o bacteriostático contra patógenos bacterianos (Elshaghabee et al., 2017).

El amplio uso que se les ha dado a los probióticos ha permitido que sean clasificados como *Reconocidos Generalmente como Seguros* (del inglés GRAS, General Recognized As Safe) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Wang et al., 2022; Saxelin, 2008; Amagase, 2008). Para ello, las cepas candidatas a ser verdaderos probióticos deben ser examinadas cuidadosamente, tanto a nivel fenotípico como genotípico (Castro-López et al., 2022; Kuebutornye et al., 2020; Sonnenschein et al., 2021). Esto es así porque algunos estudios han demostrado que incluso bacterias comúnmente aceptadas como seguras -por ejemplo cepas de *Lactobacillus*-, pueden causar problemas serios de salud en individuos inmunodeprimidos o con patologías previas. Además, hay que verificar que están libres de genes de resistencia a antibióticos o de genes de virulencia, ya que siempre hay un inherente riesgo de que estos determinantes de virulencia o resistencia puedan ser transmitidos a otras bacterias (Colautti et al., 2022; Doron and Snyderman, 2015; Li et al., 2019; Daniali et al., 2020).

Bacteriófagos

Además de la utilización de bacterias -o levaduras- como probióticos en acuicultura, recientemente han proliferado los artículos relacionados con el aislamiento y caracterización de bacteriófagos contra patógenos de peces (Ramos-Vivas et al., 2021b). La utilización de bacteriófagos contra bacterias patógenas es una estrategia antigua. Los bacteriófagos -o simplemente fagos- son los microorganismos más abundantes del planeta. Se ha estimado que por cada bacteria que hay en la Tierra pueden existir por lo menos 10 virus bacteriófagos. Su descubridor fue el francés Félix d'Herelle. Este científico se dedicaba a principios del siglo pasado a estudiar infecciones bacterianas en una especie de saltamontes habitual en tierras de México, viajando y realizando otras investigaciones en Sudamérica y el norte de África. A su regreso a Francia, comenzó a estudiar un brote de disentería —causada por la bacteria *Shigella dysenteriae*— que estaba afectando a un escuadrón de caballería del ejército francés cerca de la ciudad de París. Había observado “calvas” -zonas- de bacterias muertas sobre placas de cultivos microbiológicos del bacilo, y pensó que posiblemente eran producto de algún tipo de microorganismo filtrable, pues éste atravesaba filtros normales utilizados para esterilizar cultivos de bacterias. Un día, descubrió que los cultivos líquidos del bacilo de la disentería que tenían una turbidez evidente debido al crecimiento bacteriano la tarde anterior, aparecieron transparentes, como si las bacterias hubieran sido destruidas. En 1917 publicó un artículo en la revista de la Academia de Ciencias de París con el título: “*Sobre un microbio invisible antagonista de bacilos disentéricos*” (D'Herelle, 2007). A este antagonista lo denominó bacteriófago. Poco más tarde, se evidenció que dos años antes, en 1915, había aparecido en The Lancet otro artículo titulado: “*Una investigación sobre la naturaleza de los virus ultra-microscópicos*” (Twort, 1915), escrito por el médico inglés Frederick William Twort (Camberley, 1877-1950). Al final de este artículo, Frederick Twort reconoce que no tenía financiación suficiente para continuar con sus investigaciones...

Frederick Twort publicó posteriormente numerosos trabajos sobre sus investigaciones con fagos, y quizás un buen resumen de ellos puede apreciarse en su trabajo recopilatorio publicado en The Lancet titulado “*Nuevas investigaciones sobre la naturaleza de los virus ultramicroscópicos y su cultivo*” (Twort, 1936).

Los ensayos en humanos con fagos fueron muy controvertidos antes de la Segunda Guerra Mundial, ya que hasta que no se inventó y optimizó el microscopio electrónico en la década de los años 40, muchos de los experimentos realizados en esa época con filtrados resultantes de la lisis de cultivos bacterianos parecían un completo misterio.

La puntilla general a los intentos de establecer una verdadera terapia fágica -sobre todo en países del Oeste de Europa- la dio la década de los años 40 del siglo pasado, con el descubrimiento de la Penicilina y otros antibióticos que siguieron al hallazgo de Fleming. Los antimicrobianos parecían armas infalibles contra las enfermedades infecciosas, por lo que se abandonaron la mayoría de los estudios con bacteriófagos. Sin embargo, en algunas partes de la antigua Unión Soviética -Europa del Este- se continuó investigando y realizando terapias basadas en cultivos de fagos. Pero las publicaciones derivadas de esos estudios no han sido consideradas lo suficientemente rigurosas como para merecer la atención de occidente. Básicamente, muchos estudios con fagos parecían ser bastante irreproducibles, debido a que no se conocía bien su biología. Con el aumento vertiginoso que está experimentando la resistencia de las bacterias a los antibióticos, y a la imperiosa necesidad de mantener activos a los antibióticos de los que disponemos en los hospitales, los estudios con virus bacteriófagos han comenzado a volver a realizarse de forma masiva en occidente, y en los últimos 22 años hemos pasado de los 1500 artículos que contenían la palabra bacteriófago o fago en el año 2000, a los casi 3.300 publicados en 2022.

Pero en otros campos de investigación como en la medicina veterinaria, la acuicultura, o incluso en la industria alimentaria, el poder bactericida de los fagos también ha desatado un interés evidente (Ramos-Vivas et al., 2021a). En este sector, utilizar antibióticos o productos químicos está cada vez peor visto de cara al consumidor, así que para el control de poblaciones bacterianas, los fagos son una posibilidad real que está volviendo a tomarse en serio.

Biología de los bacteriófagos

Los bacteriófagos, también conocidos simplemente como fagos, se presentan de nuevo como una alternativa a los compuestos antimicrobianos contra las bacterias, ya que su estrechísimo rango de huéspedes les confiere una elevada especificidad. Además, no poseen efectos secundarios adversos de los antibióticos (Nagel et al., 2022; Ghosh et al., 2019). Por si fueran pocos argumentos, los fagos producen enzimas con actividad lítica que “perforan” la pared celular de las bacterias -las llamadas lisinas fágicas-, lo que les confiere un potencial biotecnológico muy importante.

Distribución de los bacteriófagos

Añadiendo más ventajas de los fagos, otra muy importante es que los virus que infectan bacterias son ubicuos en la naturaleza, especialmente en los ambientes acuáticos, tanto de agua dulce como de agua salada, lo que representa una fuente enorme de viriones y fagos, y por lo tanto de enzimas líticas. Se estima que en nuestro planeta hay al menos 10^{31} bacteriófagos (Mushegian, 2020; Simmonds et al., 2017).

En el agua de mar, los fagos juegan un papel crucial sobre la variabilidad de las comunidades microbianas que regulan los ciclos biogeoquímicos en los océanos (Wigington et al., 2016; Zhang et al., 2020; Winter et al., 2004; Roux et al., 2016). Algunos estudios cuantitativos sobre aguas marinas utilizando microscopía electrónica de transmisión han demostrado que los virus sin cola son los más abundantes, seguidos por los fagos con cola de las familias *Myoviridae* y *Podoviridae* (Brum et al., 2013). Se estima que puede haber aproximadamente unos 10 millones de partículas fágicas tan solo en un mililitro de agua de mar (Luo et al., 2017; Adriaenssens et al., 2021; Garin-Fernandez et al., 2018; Zeigler Allen et al., 2017; Mizuno et al., 2016). Por si fuera poco los peces, los moluscos y los crustáceos de esos ambientes marinos albergan “hordas” de fagos en sus tractos digestivos (Bettarel et al., 2018; He and Yang, 2015; Gadoin et al., 2021b; Gadoin et al., 2021a. Esto ya fue evidenciado hace más de 30 años, cuando se detectaron fagos en los tejidos de peces tras exponer a los animales a una alta concentración de bacteriófagos de *Escherichia coli* (Fattal et al., 1988).

Esos datos nos indican claramente que el reservorio de fagos y por lo tanto de las proteínas que codifican sus genes es enorme, y debido la mejora en los procesos de secuenciación masiva y al incremento de las herramientas bioinformáticas de las que disponemos, la distribución de los fagos en ecosistemas acuáticos y en los organismos que viven en esos ecosistemas es un área científica que está experimentando un crecimiento exponencial. Quizás una de las cifras más impresionantes que consiguen los fagos es que se estima que matan alrededor del 40 % de la población de bacterias marinas cada día, y que el flujo de carbono de la biomasa de fagos se estima en 145 Gigatoneladas por año, lo que supone un papel esencial en el ciclo del carbono de nuestro planeta (Gao et al., 2022). A parte de los ecosistemas acuáticos y de sus habitantes, los fagos son especialmente abundantes en el suelo (Wommack et al., 2015; Anand et al., 2016), en el tracto digestivo de mamíferos y aves terrestres (Shkoporov and Hill, 2019; Guerin and Hill, 2020; Harvey and Holmes, 2022; Shan et al., 2022), e incluso en los alimentos (Kennedy et al., 1986; Gautier et al., 1995).

Ciclo de vida de los bacteriófagos

Los bacteriófagos, como cualquier otro virus, dependen del metabolismo de su hospedador natural para multiplicarse. Durante el proceso de multiplicación, los fagos utilizan los recursos de la bacteria para producir una progenie de virus -entre decenas y miles- que termina matando al hospedador (Dion et al., 2020).

Como primera etapa de la biología de estos virus, está la infección de la bacteria hospedadora. Para realizar la etapa de adherencia y unión a los receptores específicos de la bacteria, los fagos tienen ligandos altamente específicos para estructuras superficiales de las bacterias, como los polisacáridos capsulares y moléculas de la membrana externa de la bacteria como el lipopolisacárido y el peptidoglicano. Algunos fagos tienen ligandos para receptores presentes en otras estructuras superficiales como las fimbrias, los pili y los flagelos bacterianos (Washizaki et al., 2016; Dunne et al., 2018; Bertozzi Silva et al., 2016; Thanki et al., 2018; Hyman and Abedon, 2010). Al igual que los virus eucariotas, los fagos inyectan su ácido nucleico en el citoplasma bacteriano y a partir de ese momento secuestran la maquinaria molecular de la bacteria para conseguir una extensa replicación del genoma fágico con el objetivo de producir un ciclo replicativo denominado lítico,

porque termina invariablemente con la destrucción de la bacteria hospedadora Figura 1. En algunos casos, el genoma del fago recién insertado en la bacteria puede seguir otro camino. Puede insertarse en el propio genoma de la bacteria pasando a ser un profago. El proceso de incorporación del genoma del fago al genoma de la bacteria se denomina lisogenización, y en este caso hablamos de un ciclo de vida lisogénico en lugar de lítico. De esta manera, el material genético -o parte de él- es transferido a la descendencia e la bacteria tras cada ronda de división celular (Figura 1). Una característica asociada al ciclo lisogénico es que las nuevas bacterias no producirán nuevas partículas víricas hasta que las condiciones no sean favorables para el fago, o hasta que algún estímulo externo estrese a la bacteria y active el mecanismo lítico del fago. Un tercer tipo de ciclo reproductivo menos conocido de los fagos es el llamado ciclo pseudolisogénico, en el cual la información codificada en el genoma del fago no se expresa rápidamente. Quizás porque la bacteria vive en un ambiente con baja disponibilidad de nutrientes y no alcanza un nivel de energía necesario para su mantenimiento óptimo. Sin embargo, los fagos en pseudolisogenia podrían entrar en ciclo lítico o mantenerse en ciclo lisogénico (Łoś and Węgrzyn, 2012; Mäntynen et al., 2021).

La obtención y caracterización de bacteriófagos líticos es de especial interés ya que serían de primera elección para eliminar selectivamente bacterias patógenas para humanos o animales. Los fagos lisogénicos se quedarían en el genoma de su bacteria hospedadora y no se multiplicarían hasta que se dieran las condiciones favorables para ello, lo que haría difícil su control. Sin embargo, el estudio de los fagos lisogénicos es también interesante, porque evolucionan con sus bacterias hospedadoras. Así que resulta de especial interés aislar una bacteria que tenga propiedades interesantes desde el punto de vista biotecnológico o desde el punto de vista de su utilización contra patógenos y caracterizar los posibles profagos que contenga su genoma. Por otro lado, la identificación de fagos lisogénicos en las bacterias ayuda seleccionar las cepas que podrían ser menos susceptibles a fagos líticos. Así, detectando y analizando qué cepas son sensibles o resistentes a bacteriófagos líticos, o qué cepas portan ya fagos lisogénicos, la selección es mucho más rápida y eficaz.

Figura 1.

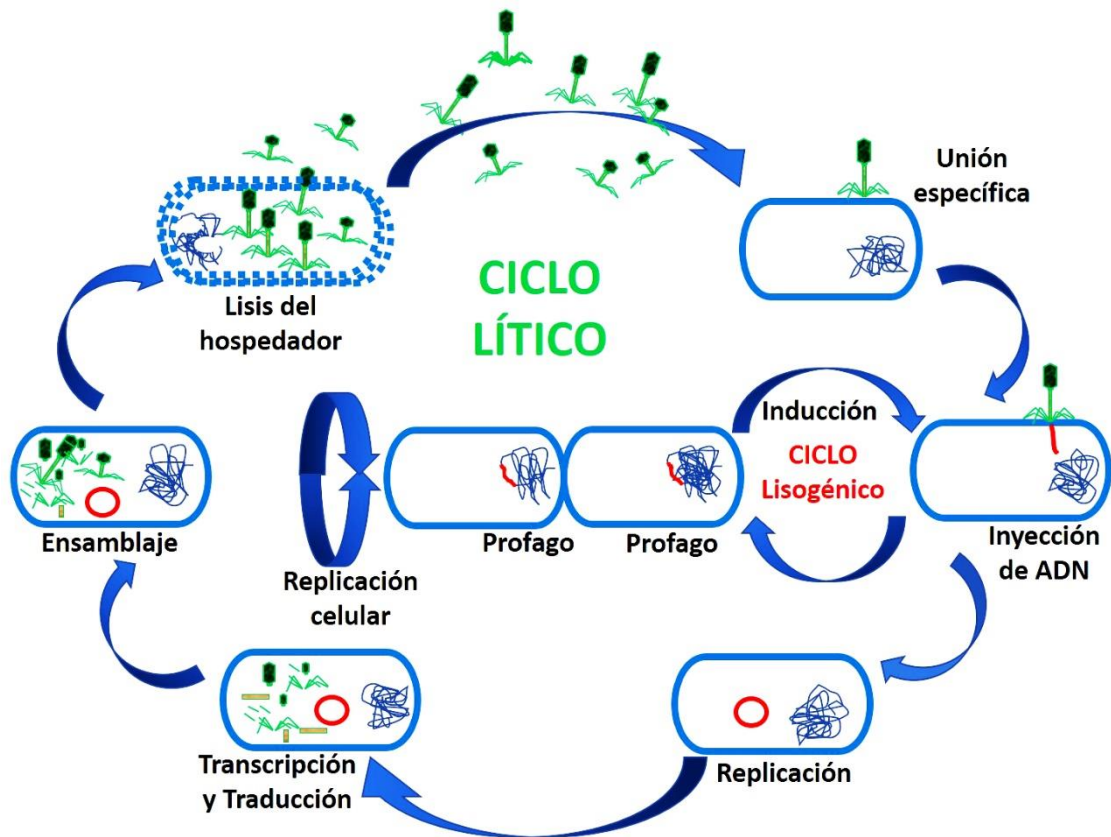


Figura 1. Ciclos de “vida” típicos de los bacteriófagos.

El ciclo lítico comprende desde la unión del bacteriófago a la bacteria hospedadora, hasta la destrucción de la bacteria y la liberación de la progenie de fagos. En el ciclo lisogénico, el ADN del fago se integra en el genoma de la bacteria y se replica con él, sin más consecuencias para la bacteria o su progenie.

Enzimas líticas de fagos y despolimerasas

Existen tres clases de enzimas que hidrolizan la pared celular de las bacterias: la lisozima, las autolisinas bacterianas y las lisinas fágicas. Las distintas clases de lisozimas -por ejemplo las animales- tienen la habilidad de hidrolizar el enlace glicosídico β -(1,4) que existe entre el ácido N-acetilmurámico y el ácido N-acetilglucosamínico del polímero de la pared celular bacteriana llamado peptidoglicano. Su papel biológico es esencialmente el defensivo, aunque su actividad es muy limitada y a menudo muy reducida, con capacidad para lisar muy pocas bacterias y casi siempre Gram positivas. Sin embargo, algunas lisozimas también ejercen un papel como enzimas digestivas de algunos animales.

Las hidrolasas de la pared bacteriana -o autolisinas- están implicadas en el remodelado de la pared celular para mantener la integridad estructural de la bacteria, pero también participan en procesos como la división celular, el ensamblaje de algunas estructuras superficiales de las bacterias y en la estabilización de los sistemas de secreción bacterianos (Vollmer et al., 2008; Vermassen et al., 2019). Al tener la capacidad de hidrolizar la pared bacteriana, su actividad debe estar muy finamente regulada.

La tercera clase de hidrolasas son las lisinas fágicas, que tienen como diana el peptidoglicano de la pared celular. Las enzimas líticas de bacteriófagos también se conocen como enzibióticos (enzybiotics, por ENZYme antiBIOTICS). Estas enzimas son sintetizadas al final del ciclo lítico de los bacteriófagos para lisar la bacteria en cuyo interior se reproducen, llegando a lisar la bacteria “desde dentro”, principalmente en bacterias Gram negativas (Young et al., 2000). Por otro lado, en las bacterias Gram positivas, las lisinas fágicas pueden hacer poros en la membrana de la bacterias “desde afuera”, durante el momento en el que el fago se une a la superficie bacteriana (Loessner, 2005; Young, 1992; Shao and Wang, 2008). La estructura de las endolisinas puede ser globular o modular. Las endolisinas globulares pertenecen a fagos que infectan a bacterias Gram negativas, mientras que las endolisinas modulares pertenecen a fagos que infectan a bacterias Gram positivas.

Además del interés por los fagos, la utilización de sus enzimas líticas también ha comenzado a ser un campo de estudio y desarrollo muy fértil, aunque más complicado, debido a la dificultad de su obtención y purificación (Fischetti, 2018; Trudil, 2015; Rodríguez-Rubio et al., 2016). Las proteínas con actividad lítica presentes en

bacteriófagos pueden dividirse en endolisinas, exolisinas y despolimerasas. Las lisinas fágicas son las encargadas de degradar el peptidoglicano bacteriano y poseen una diversidad estructural asombrosa que obedece principalmente a la conformación del sitio de unión al peptidoglicano que tengan (Catalão et al., 2013; Vázquez et al., 2018; Broendum et al., 2018a; Cahill and Young, 2019; Rodríguez-Rubio et al., 2016; Ghose and Euler, 2020). La estructura de las lisinas determina si van a degradar la pared celular de las bacterias Gram positivas o de las bacterias Gram negativas dependiendo si poseen un dominio catalítico y un dominio de unión a la pared celular (Gram positivas) o si solo poseen un dominio catalítico (Gram negativas). La mayoría de endolisinas degradan la pared celular desde el interior de la bacteria para facilitar la liberación de las partículas fágicas fabricadas durante el ciclo lítico. Sin embargo, también existen lisinas fágicas que degradan la pared celular desde el exterior, como hemos comentado. Estas últimas se llaman exolisinas o ectolisinas y están consideradas de gran interés desde el punto de vista de su aplicación como agentes antimicrobianos. Las exolisinas tienen gran capacidad para lisar bacterias Gram positivas ya que su pared celular está expuesta directamente en la superficie de la bacteria, al contrario que en las bacterias Gram negativas, donde estas enzimas tienen que sortear el lipopolisacárido, y también frecuentemente otras estructuras como fimbrias y cápsulas. Con las ectolisinas o exolisinas no sería necesario esperar a la inducción del ciclo lítico para lisar a la bacteria (Oliveira et al., 2015; Fenton et al., 2010; Fischetti, 2010). Además, estas exolisinas pueden degradar biofilms de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. El único “pero” es que los estudios con estas enzimas han sido realizados prácticamente *in vitro* (Sharma et al., 2018; Chan and Abedon, 2015; Meng et al., 2011), mientras que con endolisinas, además de haber muchos más estudios, también se han utilizado frecuentemente para probar su actividad *in vivo*. Una ventaja adicional de estas enzimas líticas es su diversidad estructural (Dion et al., 2020; Semenyuk et al., 2020; Broendum et al., 2018b). Además, pueden ser manipuladas mediante ingeniería genética para que sean más efectivas en cuanto a su afinidad por la pared celular, o a la hora de perforarla (Gerstmans et al., 2020; Gerstmans et al., 2016; Wang et al., 2018; Yan et al., 2017; Cheleuitte-Nieves et al., 2020; Heselpoth et al., 2019). Otras enzimas menos conocidas que las endolisinas o las exolisinas son las enzimas fágicas que tienen actividad despolimerasa, también conocidas como despolimerasas fágicas. Se ha demostrado que poseen una actividad antibiofilm muy interesante ya que por ejemplo, en el caso de estos últimos, muchos componentes de la matriz son polímeros de diferente naturaleza (Pires et al., 2016; Volozhantsev et al., 2020; Lin et al., 2018). Un

biofilm es una comunidad de bacterias embebidas en una matriz compleja que les sirve de “pegamento” intercelular y también para pegarse a un sustrato -vivo o inerte-. Vivir en un biofilm incrementa las posibilidades de supervivencia de las bacterias y por lo tanto son estructuras que facilitan su patogénesis. También se ha visto que estas despolimerasas son capaces de despolimerizar los azúcares complejos o proteínas que forman las cápsulas de las bacterias -como la capa S- o las cápsulas de polisacáridos en células planctónicas. En los últimos años se han aislado y parcialmente caracterizados numerosos fagos capaces de infectar patógenos bacterianos de peces (Tabla 1). La mayoría de esos estudios han demostrado una buena eficacia de los fagos a la hora de lisar bacterias *in vitro*. En algunos casos, incluso se han llevado a cabo estudios de campo utilizando las rutas de administración disponibles (oral, intraperitoneal, intramuscular, introducidos en el alimento, o añadidos directamente al agua de los tanques).

Taxonomía

Los estudios en los que se ha analizado el comportamiento de los fagos reflejados en la tabla 1 han seguido principalmente los criterios de clasificación de Ackermann o del Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTV) (<http://www.ictvonline.org/>) para identificar a esos fagos (Ackermann, 2007; Ackermann, 2009). La clasificación de los fagos se basa principalmente en el tipo de ácido nucleico, la estructura y morfología de la partícula vírica, el modo de replicación, su diana en el hospedador bacteriano e incluso por su distribución geográfica (Pietilä et al., 2014). Los investigadores que trabajan en acuicultura utilizan principalmente el microscopio TEM y la sensibilidad de los ácidos nucleicos a las nucleasas (RNAsa o DNAsa) para determinar la morfología y el tipo de ácido nucleico de los fagos. En los últimos años, se han introducido otras técnicas como la crio-microscopía electrónica, y la cristalografía de rayos X. Para una mejor clasificación y caracterización, cada vez se utiliza más la información genómica (Adriaenssens et al., 2015; Lavigne et al., 2009; Lavigne et al., 2008).

Los bacteriófagos poseen principalmente tres morfologías características: formas filamentosas, icosaédricas e icosaédricas con una cola a través de la cual inyectan su ácido nucleico desde la cápside. Esta última morfología es la más conocida, y tiene tres componentes básicos, una cápside donde se empaqueta un ácido desoxirribonucleico de

doble cadena, una cola que puede ser rígida o flexible, corta o larga y que sirve de “jeringa” para inyectar el ADN en la bacteria, y, finalmente, un sistema de reconocimiento de la superficie de la bacteria formado por fibras conocidas como fibras de la cola. Otras estructuras no poco habituales son, una placa basal a partir de la cual sale las fibras de la cola, un collar debajo de la cápside que hace de puente entre ésta y la cola, los denominados “bigotes” que pueden asomar en la parte alta de la cola, cerca del collar, y por último, en la placa basal, las espículas (Koskella et al., 2022; Kuhn and Thomas, 2022).

Inducción del ciclo lítico/lisogénico de bacteriófagos

Como hemos visto, es importante conocer el ciclo de vida de los bacteriófagos tanto de patógenos de peces como de bacterias que viven en ambientes acuáticos o en instalaciones donde se realiza el cultivo de especies acuáticas de cara a la producción de alimentos para el ser humano. De esta manera, poder aislar y caracterizar tanto las bacterias que portan profagos como los propios virus bacteriófagos, es de interés desde diferentes puntos de vista, por ejemplo, conocer los ciclos de los bacteriófagos puede ayudarnos a controlar las poblaciones susceptibles de bacterias. Mientras que para buscar fagos líticos se utilizan generalmente técnicas de enriquecimiento con la bacteria hospedadora (Tabla 1), para conocer la presencia de profagos con ciclo lisogénico se utilizan generalmente agentes que “estresan” a la bacteria, como la radiación ultravioleta o la Mitomicina C. La identificación de fagos lisogénicos en bacterias presentes en instalaciones de acuicultura puede ayudarnos a futuras investigaciones sobre la producción de compuestos o para el control biológico de dichas cepas.

TABLA 1. Bacteriófagos utilizados para el estudio o control de patógenos bacterianos en acuicultura						
Bacteria Gram-negativa diana	Origen	Método de caracterización	Nombre del fago	Familia	Longitud del genoma	Referencia/s
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Agua de río	TEM	φ2 and φ5	<i>Myoviridae</i>	~20 kb	(Le et al., 2018)
	Estanques; Ríos contaminados	TEM	N21, W3, G65, Y71 and Y81	<i>Myoviridae</i> ; <i>Podoviridae</i>	n.d.	(Liu et al., 2020)
	Agua de arroyo	TEM, dsDNA	pAh-1	<i>Myoviridae</i>	~64 kb	(Easwaran et al., 2017)
	Agua de mar	TEM, secuenciación de ADN	Akh-2	<i>Siphoviridae</i>	114,901 pb	(Akmal et al., 2020)
	Tejidos de carpa	TEM	AHP-1	<i>Myoviridae</i>	n.d.	(Chandrarathna et al., 2020)
	Agua de lago	TEM, dsDNA, secuenciación de ADN	AhyVDH1	<i>Myxoviridae</i>	39,175 pb	(Cheng et al., 2021)
	Agua de río	TEM, dsDNA, secuenciación de ADN	MJG	<i>Podoviridae</i>	45,057 pb	(Cao et al., 2019)
	Aguas residuales	TEM	AH1	n.d.	n.d.	Wu et al., 1981()
	Agua de estanque de pez gato rayado	TEM, dsDNA, secuenciación de ADN	PVN02	<i>Myoviridae</i>	51,668 pb	(Tu et al., 2020) (Hoang A et al., 2019)
	Agua de río	TEM, dsDNA	pAh1-C pAh6-C	<i>Myoviridae</i>	55 kpb 58 kpb	(Jun et al., 2013)
	Agua de un arroyo	TEM, secuenciación de ADN	Ahy-yong1	<i>Autographiviridae</i>	43,374	(Pan et al., 2022a)
	Aguas residuales	TEM, dsDNA, secuenciación de ADN	Ahp2	<i>Myoviridae</i>	47,331 pb	(J.-B. Wang et al., 2021)
	Aguas residuales	TEM, dsDNA, secuenciación de ADN	Ahp1	<i>Podoviridae</i>	~42 kpb	(Wang et al., 2016)
<i>A. punctata</i>	Agua de corriente	TEM, dsDNA	IHQ1	<i>Myoviridae</i>	25-28 kpb	(Ul Haq et al., 2012)
<i>A. salmonicida</i>	Ambientes acuáticos (río, lago)	TEM, secuenciación de ADN	HER98, ER110	<i>Myoviridae</i>	173,590 pb, 236,567 pb	(Hosseini et al., 2021) (Vincent et al., 2017)
	River waters, two passing through fish farms	TEM, secuenciación de ADN	SW69-9 L9-6 Riv-10	<i>Myoviridae</i>	173,097 pb, 173,578 pb and 174,311 pb	(Vincent et al., 2017)
	Agua de río	TEM, secuenciación de ADN	phiAS5	<i>Myoviridae</i>	225,268 pb	(Ji Hyung Kim et al., 2012b)
	Sedimento en granja de trucha arco iris	TEM, dsDNA, secuenciación de ADN	PAS-1	<i>Myoviridae</i>	~48 kb	(J. H. Kim et al., 2012)
	Wastewater from a seafood market	TEM, secuenciación de ADN	AsXd-1	<i>Siphoviridae</i>	39,014 pb	(Yang et al., 2018)
	Sewage network water from a lift station	TEM	AS-A AS-D AS-E	<i>Myoviridae</i>	n.d.	(Silva et al., 2016) (Duarte et al., 2021)

	Agua de río	TEM	HER 110	<i>Myoviridae</i>	n.d.	(Imbeault et al., 2006) (Petrov and Karam, 2004)
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	Aguas residuales de mercado de peces y mariscos	TEM, secuenciación de ADN	ZHA, ZHD, ZHF	<i>Myoviridae</i>	161,887 pb	(Xu et al., 2021)
<i>Aeromonas</i> spp.	Contenido gastrointestinal de varias especies de peces	TEM, secuenciación de ADN	phiA8-29	<i>Myoviridae</i>	144,974 pb	(He et al., 2019)
<i>Citrobacter braakii</i>	Aguas residuales	TEM, secuenciación de ADN	vB_CbrM_HP1	<i>Myoviridae</i>	89,355 pb	(Huang et al., 2022)
<i>C. freundii</i>	Aguas residuales	TEM, secuenciación de ADN	IME-JL8	<i>Siphoviridae</i>	49,838 pb	(Jia et al., 2020)
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	Agua de estanques de pez gato	TEM, dsDNA, secuenciación de ADN	eiAU eiDWF eiMSLS	<i>Siphoviridae</i>	42.80 kpb 42.12 kpb 42.69 kpb	(Walakira et al., 2008) (Carrias et al., 2011)
	Agua de río	Secuenciación de ADN	PEi21	<i>Myoviridae</i>	43,378 pb	(Yasuike et al., 2014) (Hassan et al., 2012)
	Striped catfish kidney and liver	TEM, dsDNA	MK7	<i>Myoviridae</i>	~34 kb	(Hoang et al., 2018)
	Muestra de lodo de una piscifactoría	TEM, secuenciación de ADN	PVN06, PVN09	<i>Myoviridae</i> , <i>Autographiviridae</i>	44,032 pb, 37,945 pb	(Nguyen et al., 2021)
<i>E. tarda</i>	Agua de mar	TEM, dsDNA	ETP-1	<i>Podoviridae</i>	~40 kb	(Nikapitiya et al., 2020)
	Agua de río	TEM, secuenciación de ADN	pEt-SU	<i>Myoviridae</i>	276,734 pb	(Kim et al., 2020)
	Aguas residuales	secuenciación de ADN	PETp9	<i>Myoviridae</i>	89,762 pb	(Cui et al., 2020)
	Tejidos de peces y agua de mar	TEM, secuenciación de ADN	GF-2	<i>Myoviridae</i>	43,129 pb	(Yasuike et al., 2015)
<i>Flavobacterium columnare</i>	Agua de río	TEM, secuenciación de ADN	FCL-2	<i>Myoviridae</i>	47,14 pb	(Almeida et al., 2019) (Laanto et al., 2015) (Laanto et al., 2011)
	Agua de estanque de peces y sedimentos del fondo	TEM, dsDNA	FCP1-FCP9	<i>Podoviridae</i>	n.d.	(Prasad et al., 2011)
	Agua de tanque de piscifactoría	TEM, secuenciación de ADN	34 fagos diferentes.	Diferentes familias	Diferentes tamaños	(Runtuvuori-Salmela et al., 2022)
<i>F. psychrophilum</i>	Agua de granja de trucha arco iris	TEM, dsDNA	^a (FpV-1 to FpV-22)	<i>Podoviridae</i> <i>Siphoviridae</i> <i>Myoviridae</i>	(~8 to ~90 kb)	(Christiansen et al., 2014) (Stenholm et al., 2008) (Donati et al., 2021)
	Riñones de ayu y agua de estanque recolectada de granjas de ayu	TEM, dsDNA	PFpW-3, PFpC-Y PFpW-6, PFpW-7 PFpW-8	<i>Myoviridae</i> ; <i>Podoviridae</i> ; <i>Siphoviridae</i>	n.d.	(Kim et al., 2010)
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	Ostras crudas	TEM, dsDNA	Phda1	<i>Myoviridae</i>	35.2–39.5 kb	(Yamaki et al., 2015)
	Tracto gastrointestinal del tiburón gato	TEM, secuenciación de ADN	vB_Pd_PDCC-1	<i>Myoviridae</i>	237,509 pb	(Veyrand-Quirós et al., 2020)
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Agua de estanque de ayu y peces enfermos	TEM, secuenciación de ADN	PPpW-3 PPpW-4	<i>Myoviridae</i> <i>Podoviridae</i>	43,564 pb 41,386 pb	(Kawato et al., 2015) (Park et al., 2000)

<i>P. aeruginosa</i>	Aguas residuales	TEM, secuenciación de ADN	MBL	n.d.	42519 pb	(Khaimar et al., 2013)
<i>Shewanella spp.</i>	Aguas residuales de un mercado	TEM, secuenciación de ADN	SppYZU01 to SppYZU10	<i>Myoviridae</i> ; <i>Siphoviridae</i> .	SppYZU01 (43.567 pb) SppYZU5 (54.319 pb)	(Yang et al., 2019)
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Agua de mar	TEM, secuenciación de ADN	PTm1 PTm5	<i>Myoviridae</i>	224,680 pb 226,876 pb	(Kawato et al., 2020)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Agua de un tanque de acuicultura	TEM, secuenciación de ADN	VEN	<i>Podoviridae</i>	44,603 pb	(Kokkari et al., 2018)
	Sedimento marino	TEM, secuenciación de ADN	ValKK3	<i>Myoviridae</i>	248,088 pb	(Lal et al., 2016a)
	Agua de mar	TEM, dsDNA	St2 Grn1	<i>Myoviridae</i>	250,485 pb 248,605 pb	(Kalatzis et al., 2016)
	Agua de tanque con <i>Artemia salina</i>	TEM, secuenciación de ADN	Artemius	<i>Siphoviridae</i>	43,349 kpb	(Droubogiannis et al., 2022)
<i>V. anguillarum</i>	Soft tissues from clams and mussels	TEM, dsDNA	309 ALMED CHOED ALME CHOD CHOB	Distintas morfologías	~47-48 kb	(Higuera et al., 2013)
	Aguas residuales	dsDNA	VP-2 VA-1	n.d.	n.d.	(Silva et al., 2014)
	Muestras de agua de piscifactorías	TEM, secuenciación de ADN	*H1, H7, S4-7, H4, H5 H8, H20 S4-18, 2E-1, H2	<i>Myoviridae</i> <i>Siphoviridae</i> <i>Podoviridae</i>	~194-95 kb ~50 kb ~45-11 kb	(Tan et al., 2014)
<i>Vibrio campbellii</i>	Cepa huésped (<i>V. campbellii</i>) aislada de un camarón muerto	TEM, secuenciación de ADN	HY01	<i>Siphoviridae</i>	41.772 bp	(Nuidate et al., 2021)
	Hepatopáncreas de camarones blancos del Pacífico	dsDNA, secuenciación de ADN	vB_Vc_SrVc9	<i>Autographiviridae</i>	~43,15 kb	(Lomeli-Ortega et al., 2021)
<i>V. harveyi</i>	Granja camaronera, criaderos y agua marina	TEM, dsDNA	A	<i>Siphoviridae</i>	n.d.	(Vinod et al., 2006)
	<i>Vibrio harveyi</i> como hospedador	TEM, dsDNA	VHML	<i>Myovirus-like</i>	n.d.	(Oakey and Owens, 2000)
	Agua del estanque de camarones	TEM, dsDNA	PW2	<i>Siphoviridae</i>	~46 kb	(Phumkhachorn y Pattanachaikunsopon, (2010)
	Muestras de sedimentos de agua	TEM, dsDNA	VHM1, VHM2 VHS1	<i>Myoviridae</i> , <i>Siphoviridae</i>	~55 kb, ~66 kb ~69 kb	(Stalin and Srinivasan, 2017)
	Agua y tejidos de ostras	TEM, dsDNA	vB_VhaS-a vB_VhaS-tm	<i>Siphoviridae</i>	~ 82 kb ~59 kb	(Wang et al., 2017)

	Muestras comerciales de almejas	Análisis genómico, dsDNA	° VhCCS-01 VhCCS-02 VhCCS-04 VhCCS-06 VhCCS-17 VhCCS-20 VhCCS-19 VhCCS-21	<i>Siphoviridae</i> , <i>Myoviridae</i>	n.d.	(Crothers-Stomps et al., 2010)
	Muestras de ostras, almejas, camarones y agua de mar	TEM, secuenciación de ADN	VHP6b	<i>Siphoviridae</i>	78,081 pb	(Raghu Patil et al., 2014)
	Criadero de camarones y agua de granja, ostras de estuarios, agua de mar costera	TEM, dsDNA	Viha10 Viha8 Viha9 Viha11 Viha1 to Viha7	<i>Siphoviridae</i> - <i>Siphoviridae</i> <i>Myoviridae</i> (Viha4)	n.d. ~44-94 kb ~85 kb (Viha4)	(Karunasagar et al., 2007) (Shivu et al., 2007)
	Muestra de agua de mar	TEM	VhKM4	<i>Myoviridae</i>	n.d.	(Lal et al., 2017)
<i>V. ordalii</i>	Mejillones macerados	TEM, secuenciación de ADN	B_VorS-PVo5	<i>Siphoviridae</i>	80,578 pb	(Echeverría-Vega et al., 2016)
<i>V. owensii</i>	Agua en ambiente coralino	TEM, secuenciación de ADN, dsDNA	Phi50-12	<i>Schitoviridae</i>	68,059 pb	(Lin and Tsai, 2022)
<i>V. parahaemolyticus</i>	Ostras de mercado	TEM, secuenciación de ADN	VPT02	<i>Siphoviridae</i>	120,547 pb	(You et al., 2021)
	Aguas residuales	TEM, dsDNA	VPp1	<i>Tectiviridae</i>	~15 kb	(Yong et al. 2013)
	Agua de mar contaminada	TEM, dsDNA	KVP40 KVP41	<i>Myoviridae</i>	n.d.	(Matsuzaki et al., 2000) (Matsuzaki et al., 1992)
	Agua de mar o mejillones	dsDNA	SPA2 SPA3	n.d.	~ 21 kb	(Onarinde and Dixon, 2018)
	Costa marina	TEM, secuenciación de ADN	pVP-1	<i>Siphoviridae</i>	111,506 pb	(Ji Hyung Kim et al., 2012a) (Jun et al., 2014)
	<i>V. parahaemolyticus</i> aislado de muestras de aguas residuales recogidas en un mercado de productos acuáticos	TEM, secuenciación de ADN	vB_VpS_BA3 vB_VpS_CA8	<i>Siphoviridae</i>	58,648 pb 58,480 pb	(Yang et al., 2020)
	Agua del estanque de camarones	TEM, secuenciación de ADN	VP-1	<i>Myoviridae</i>	150,764 pb	(Matamp and Bhat, 2020)
	Sedimentos de arena costera	TEM, secuenciación de ADN	VpKK5	<i>Siphoviridae</i>	56,637 pb	(Lal et al., 2016b) (Lal and Ransangan, 2015)

<i>V. splendidus</i>	Aguas residuales sin tratar obtenidas de criaderos locales	TEM	PVS-1, PVS-2 PVS-3	<i>Myoviridae</i> ; <i>Siphoviridae</i>	n.d.	(Li et al., 2016)
	Agua de mar cerca de una jaula de piscifactoría	TEM, secuenciación de ADN	vB_VspP_pVa5	<i>Podoviridae</i>	78,145 pb	(Katharios et al., 2017)
<i>Vibrio sp.</i>	Salidas de drenaje de aguas residuales	TEM, secuenciación de ADN	VspDsh-1 VpaJT-1 ValLY-3 ValSw4-1 VspSw-1	<i>Siphoviridae</i>	46,692 pb 60,177 pb 76,310 pb 79,545 pb 113,778 pb	(Chen et al., 2019)
	Aguas residuales de mercado local	TEM, secuenciación de ADN	OY1	<i>Autographiviridae</i>	43,479 pb	(L. Gao et al., 2022)
<i>V. coralliilyticus</i>	Aguas residuales en criadero de ostras	TEM	pVco-14	<i>Siphoviridae</i>	n.d.	(Kim et al., 2019)
<i>V. vulnificus</i>	Aguas residuales	TEM, secuenciación de ADN	SSP002	<i>Siphoviridae</i>	76,350 pb	(Lee et al., 2012) (Lee et al., 2014)
	Molusco gasterópodo	TEM, secuenciación	VVPoo1	<i>Siphoviridae</i>	76,423 pb	(Kim et al., 2021)
	Initial host strain (<i>V. vulnificus</i>)	TEM	VV1 VV2 VV3 VV4	<i>Tectiviridae</i>	n.d.	(Srinivasan and Ramasamy, 2017)
<i>Yersinia ruckeri</i>	Aguas residuales que contienen heces de trucha suspendidas, EN un estanque de sedimentación de la granja de truchas	TEM	NC10	<i>Podoviridae</i>	n.d.	(Welch, 2020)
	Aguas residuales	TEM	YerA41 (varios fagos)	Cabeza icosaédrica, y cola contráctil	n.d.	(Stevenson and Airdrie, 1984) (Leskinen et al., 2020a)
	Aguas residuales	TEM, secuenciación de ADN, dsDNA	R1-37	<i>Myoviridae</i>	~270 kb	(Kiljunen et al., 2005) (Leskinen et al., 2020b)

Tabla 1. Implementada a partir de (Ramos-Vivas et al., 2021b). * Clasificación determinada por los autores; TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión); dsDNA (Tratamiento con DNAsa); n.d. (No determinado); °Se aislaron varias cepas pero solo una fue seleccionada y caracterizada. En negrita, el fago secuenciado de la serie.

Tabla 1. Continuación. Fagos utilizados contra patógenos Gram positivos de peces y moluscos.

Bacteria Gram positivo diana	Fuente	Método de caracterización	Nombre de la cepa de fago	Familia*	Tamaño del genoma	Referencia/s
<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>L. garvieae</i> aislada de jurel enfermo	TEM, dsDNA	PLgY(16)	<i>Siphoviridae</i>	n.d.	(Park et al., 1997)
	Jurel (Y) Agua (W) Sedimentos (S)	TEM, dsDNA	PLgW1-6 PLgY16 PLgY30 PLgY886 PLgS1	<i>Siphoviridae</i>	>20 kbp	(Park et al., 1998, Nakai et al., 1999, Ooyama et al., 2002)
	Compost doméstico	TEM, secuenciación ADN	GE1	<i>Siphoviridae</i>	24,847 bp	(Eraclio et al., 2015)
	<i>L. garvieae</i> como hospedador	TEM, secuenciación ADN	PLgT-1	<i>Siphoviridae</i>	29,284 bp	(Hoai et al., 2016, Hoai and Yoshida, 2016, Hoai et al., 2019)
	Agua de piscifactoría de trucha	TEM, secuenciación ADN	WP-2	<i>Picovirinae</i>	18,899 bp	(Ghasemi et al., 2014)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Estanque de tilapia	TEM	HN48	<i>Caudoviridae</i>	n.d.	(Luo et al., 2018)
<i>S. iniae</i>	<i>S. iniae</i> como hospedador	TEM, dsDNA	vB_SinS-44 vB_SinS-45 vB_SinS-46 vB_SinS-48	<i>Siphoviridae</i>	~51.7 kb ~28.4 kb ~66.3 kb ~27.5 kb	(Wright et al., 2013)
<i>Weissella ceti</i>	<i>W. ceti</i> como hospedador	TEM	PWc	<i>Siphoviridae</i>	38783 bp	(Hoai et al., 2018)

Tabla 1 continuación. Implementada a partir de (Ramos-Vivas et al., 2021b). * Clasificación determinada por los autores; TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión); dsDNA (Tratamiento con DNAsa); n.d. (No determinado); #Se aislaron varias cepas pero solo una fue seleccionada y caracterizada. En negrita, el fago secuenciado de la serie.

Objetivos

Objetivos

Nuestra hipótesis de partida es que las instalaciones donde se cultivan peces y moluscos pueden ser una fuente notable de bacterias con capacidad probiótica o de interés biotecnológico. Partiendo de la base de la gran diversidad bacteriana que hay en estos ambientes, nos hemos propuesto una serie de objetivos de cara a aislar y caracterizar algunas de estas bacterias.

En primer lugar pretendemos realizar una serie de búsquedas de bacterias en distintas zonas del Instituto ECOAQUA donde se cultivan especies acuáticas. Una vez obtenidas estas bacterias haremos ensayos de antagonismo frente a patógenos comunes que afectan a la acuicultura canaria -principalmente marina- y también a la acuicultura de agua dulce. Estas bacterias podrían mostrar un carácter probiótico, al competir directamente contra patógenos que pueden atacar esos cultivos de peces y moluscos.

Además del clásico ensayo de antagonismo para comprobar la capacidad bactericida o bacteriostática, o la producción de compuestos antibióticos por las cepas aisladas, enfrentaremos las bacterias a un indicador de la producción de moléculas de Quorum-Sensing, ya que estas moléculas participan en la generación de algunos fenotipos bacterianos de interés. En este caso, utilizaremos una cepa de la especie *Chromobacterium violaceum*, con vistas a encontrar alguna bacteria presente en las instalaciones de acuicultura que presente antagonismo frente a *C. violaceum*, o actividad inhibitoria de la producción del pigmento violaceína, característico en esta especie de la actividad de QS.

Para establecer claramente un beneficio potencial de las cepas probióticas que muestren antagonismo frente a patógenos de interés, debemos realizar pruebas adicionales. Una prueba de especial interés es la capacidad de adherencia. Por lo tanto, otro de los objetivos del presente trabajo es evaluar la capacidad de adherencia a un sustrato inerte de las cepas aisladas en las instalaciones de acuicultura de ECOAQUA, presenten o no actividad antagonista frente a patógenos de peces.

Posteriormente, seleccionaremos un conjunto representativo de cepas para estudiar la presencia de fagos en ellas, mediante la inducción con Mitomicina C.

Después de realizar estos ensayos, seleccionaremos algunas de las cepas que presenten buena actividad antagonista y procederemos a secuenciar su genoma y el de los profagos que contengan.

Además, realizaremos fotografías con microscopía de transmisión para conocer en detalle la morfología de algunas de estas cepas y de sus fagos.

Como **objetivos específicos** hemos señalado los siguientes:

1. Aislar bacterias sin requerimientos nutricionales específicos en las instalaciones del Instituto ECOAQUA, de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
2. Probar la capacidad bactericida o bacteriostática de esas bacterias enfrentándolas *in vitro* contra una batería de patógenos de interés en acuicultura.
4. Comprobar la capacidad de formación de biofilms en las cepas aisladas.
5. Comprobar la capacidad de las cepas aisladas para inhibir el QS en una cepa *reporter* de *C. violaceum*.
6. Comprobar la presencia de profagos en las cepas aisladas mediante ensayos de Mitomicina C.
7. Proceder a la secuenciación de las cepas que presenten buena actividad antagonista frente a diferentes patógenos de peces.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y cepas tipo utilizadas:

- ***Aeromonas hydrophila*** cepa **AG2**. Departamento de Biología Celular, Universidad de León. Aislada inicialmente de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). (Jose Vivas et al., 2004)
- ***Aeromonas hydrophila*** cepa **PPD70/91**. Departamento de Biología Celular, Universidad de León. Inicialmente cedida por el profesor Dr K.Y. Leung (National University of Singapore) and Dr Fook Kheong (Agri-food & Veterinary Laboratory, Singapore). (Zhang et al., 2000)
- ***Yersinia ruckeri*** cepa (**nº1**) **CECT-955**. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Aislada inicialmente de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). (Padilla et al., 2022)
- ***Yersinia ruckeri*** cepa (**nº2**) **UL-1**. Universidad de León. Aislada inicialmente de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). (Padilla et al., 2022)
- ***Yersinia ruckeri*** cepa (**nº3**) **UL-ppi 661**. Universidad de León. Aislada inicialmente de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). (Padilla et al., 2022)
- ***Yersinia ruckeri*** cepa (**nº4**) **94/05**. Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA) Universidad de Las palmas de Gran Canaria.
- ***Yersinia ruckeri*** cepa (**nº5**) **UL-250**. Universidad de León. Aislada inicialmente de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). (Padilla et al., 2022)
- ***Streptococcus iniae*** cepa (**nº1**) **CIP 102508**. Instituto Pasteur. Aislada inicialmente de un delfín de agua dulce del Amazonas (*Inia geoffrensis*). (El Aamri et al., 2015)
- ***Streptococcus iniae*** cepa (**nº2**) **CIP 103769**. Instituto Pasteur. Aislada inicialmente de tilapia (*Oreochromis niloticus*). (El Aamri et al., 2015)
- ***Streptococcus iniae*** cepa (**nº3**) **CIP 105804**. Instituto Pasteur. Inicialmente aislada de un delfín de agua dulce del Amazonas (*Inia geoffrensis*). (El Aamri et al., 2015)
- ***Streptococcus iniae*** cepa (**nº4**) **IUSA-1**. Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA) Universidad de Las palmas de Gran Canaria. Aislada inicialmente de dorada (*Sparus aurata*). (El Aamri et al., 2012)
- ***Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*** cepa **94/99**. Aislada inicialmente de dorada (*Sparus aurata*). (Remuzgo-Martínez et al., 2014)

- *Chromobacterium violaceum* cepa **CV0Blu**, cedida por el profesor Alberto Villena (Universidad de León). (J. Vivas et al., 2004)
- *Chromobacterium violaceum* cepa **CECT-494 T** (Bergonzini 1881; NCTC 9757 ATCC 12472; CCTM la3496; CN 5665; DSM 30191; IFO 12614; NCIB 9131).

Medios de cultivo microbiológicos utilizados

- **Medio Luria Caldo** (LB, Fisher Scientific). Fórmula por litro: triptona (10 gr), extracto de levadura (5 gr) y cloruro sódico (0.5 gr).
- **Caldo de Soja y Triptona** (TSB, Scharlau). Fórmula por litro: triptona (15 gr), soja (5 gr), NaCl (5 gr), Agar (15 gr).
- **Agar de Soja y Triptona** (TSA, Scharlau). TSB suplementado con un 1.5% de agar bacteriológico.
- **Agar bacteriológico** (PanReac, AppliChem).
- **Caldo Infusión de Cerebro y Corazón** (BHIB, Oxoid). Fórmula por litro: infusión de cerebro de vaca (12.5 gr), infusión de corazón de vaca (5 gr), peptona (10 gr), Glucosa (2 gr), NaCl (5 gr), Na₂HPO₄ (2.5 gr).
- **Agar Infusión de Cerebro y Corazón** (BHIA, Oxoid). BHIB suplementado con 1.5% de agar bacteriológico). En el caso de *P. damsela* subsp. *piscicida* se suplementaron las placas de BHIA con NaCl, hasta alcanzar una concentración final del 1.5%.

Todos los medios de cultivo se esterilizaron mediante autoclave a 121°C y 15 minutos, en un autoclave Selecta.

Aislamiento de bacterias en instalaciones de acuicultura

Se tomaron muestras de distintas zonas de las instalaciones del Instituto ECOAQUA, durante el mes de junio de 2019. Principalmente, se tomaron muestras de la interfase entre el agua y el tanque en las zonas de cultivo de dorada, lubina y en los estanques de reproductores o de engorde de corvina (*Argyrosomus regius*) y de medregal (*Seriola dumerili*). Se muestrearon también los lodos del fondo del fondo de las canalizaciones abiertas de entrada y salida de las instalaciones. Además, se tomaron muestras del agua de esos mismos tanques y de los filtros de salida, y también de la zona de salida de agua de los tanques de engorde y de los reproductores de corvinas y medregales. Se tomaron muestras en el agua de las piscinas de la zona exterior del instituto. Las muestras sólidas de las paredes de los tanques de cría se tomaron con un hisopo estéril. Las muestras del fondo de las canalizaciones se tomaron con un tubo Falcon de 50 ml, arrastrando la capa adherida al fondo para recoger la parte sólida. Las muestras de agua se recogieron en tubos Falcon de 50 mL. La figura 2 muestra varios lugares de la toma de muestras realizadas en las instalaciones de ECOAQUA.

Figura 2

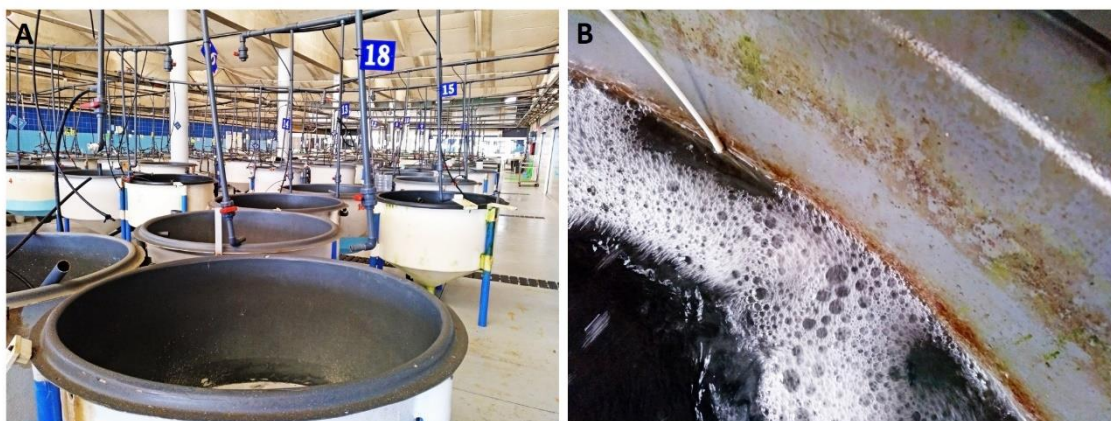


Figura 2. Toma de muestras en las instalaciones de acuicultura del Instituto ECOAQUA. A, instalaciones de cultivo de dorada y lubina. B, toma de muestras con un hisopo estéril, de un biofilm formado en la interfase entre el agua de un tanque y la pared del mismo.

Una vez tomadas las muestras se trasladaron al laboratorio de microbiología del instituto ECOAQUA y se sembraron en medio de cultivo LB Agar. A partir de las muestras tomadas con hisopos estériles se realizó una siembra en césped y a partir de las muestras

de agua se realizó una siembra de 150 µL sobre las placas utilizando esferas de vidrio. Las placas se incubaron a 26°C durante 48 horas.

Al cabo de las 48h de crecimiento, se seleccionaron las colonias individualmente, recogiendo aquellas que presentaron morfologías diferentes, atendiendo a su forma, color, elevación y rugosidad. Una vez seleccionadas las colonias individualmente, se procedió a su siembra sobre placas de LB Agar para obtener cultivos puros. Una vez que se obtuvieron cultivos puros, se realizó un cultivo en medio líquido y se procedió a congelar todas las cepas a -80°C, utilizando como criopreservante, glicerol, a un porcentaje final del 20%. Las cepas se congelaron en placas de 96 pocillos y en tubos individuales, para proceder a inocular cepas de forma masiva (con micropipetas multicanal) o individuales, cuando para algunos ensayos no era necesaria una siembra masiva.

Test de antagonismo frente a patógenos de interés en acuicultura

Para realizar los test de antagonismo bacteriano se utilizaron placas Petri de 15 o de 9 cm de diámetro. El medio utilizado para los ensayos fue aquel en el que el patógeno diana ofrecía un crecimiento óptimo a las 48 horas. Para *A. hydrophila* se utilizó medio LB Agar; para *Y. ruckeri* se utilizó medio LB Agar; para *S. iniae* se utilizó medio BHI Agar; para *P. damsela* subsp. *piscicida* se utilizó medio BHIB con un suplemento hasta el 1.5% con NaCl.

Las cepas diana se sembraron en césped utilizando 300 µl de una suspensión en PBS, a partir de placas de medio sólido. Este césped se realizó utilizando de forma general, esferas de vidrio. Posteriormente, se inocularon las cepas aisladas en las instalaciones de ECOAQUA mediante una micropipeta multicanal, inoculando 5µl de cada pocillo de las placas de 96 pocillos en donde se encontraban los stocks de las bacterias congeladas a -80°C.

Cuando el crecimiento de *C. violaceum* se ralentizaba al tercer o cuarto pase, se realizó una siembra de la cepa en césped, utilizando un hisopo estéril, directamente desde una placa de Luria agar del cultivo viejo.

Los resultados se observaron a las 48-72 h. Las placas se fotografiaron y se midió el halo de inhibición alrededor de las colonias test que dieron positivo contra alguno de los patógenos de peces o contra *C. violaceum*.

Ensayo de formación de biocapas o biofilms

Se analizó la formación de biofilms en todas las cepas aisladas en las instalaciones de ECOAQUA.

Los ensayos cuantitativos y cualitativos de formación de biofilms *in vitro* se realizaron según el método de O'Toole y Kolter (O'Toole and Kolter, 1998) con modificaciones aportadas por Remuzgo-Martínez y colaboradores (Remuzgo-Martínez et al., 2015). Para la formación de biofilms se utilizaron placas de 24 pocillos de poliestireno con fondo plano (Nunc, Thermo Fisher Scientific). Las cepas fueron cultivadas en medio LB durante 16 ± 2 horas a 27°C en agitación. A partir de este cultivo se tomaron $20\mu\text{l}$ y se depositaron en pocillos de placas de 24 (Thermo, NUNC) que contenían 1 mL de LB. Las placas se rotularon y se guardaron en sus bolsas individuales para evitar evaporación. Estos nuevos cultivos se incubaron a 27°C en estático, durante 48 ± 2 horas. Al cabo del periodo de incubación, se retiraron las células planctónicas mediante lavados sucesivos con 5 mL de agua destilada. Las placas se dejaron secar un mínimo de 20 minutos a 37°C . Tras el secado, se tiñeron las bacterias adheridas con Cristal Violeta (Sigma-Aldrich) preparado en agua destilada al 0.7%. La tinción se prolongó durante un mínimo de 12 minutos. Tras la tinción, el exceso de colorante fue retirado y se procedió a repetir los lavados con agua destilada (5 mL/pocillo). Tras los lavados con agua destilada, las placas se secaron a 37°C durante un mínimo de 20 minutos. Para la extracción del cristal violeta se utilizó ácido acético glacial (Thermo Fisher Scientific) al 33% en agua destilada. Se añadió 1 mL de ácido acético a cada pocillo y se agitaron las placas durante un minuto a temperatura ambiente, en un agitador orbital de sobremesa (PMS-1000i, GrantBio), a 400 rpm. Se recogió todo el volumen de colorante liberado -Cristal Violeta + Ácido Acético- en cada pocillo (proporcional a la densidad de biofilm formado o de bacterias adheridas) y se trasladó a pocillos de otra placa de 24 pocillos con fondo plano, para la lectura de la DO_{600} en un lector de placas. Como blanco y control de contaminación se utilizó medio de cultivo (LB) sin inocular. Este experimento se realizó con las 276 cepas aisladas en las instalaciones de ECOAQUA, en 4 experimentos independientes, haciendo un total de 1.104 lecturas.

Los datos de cuantificación de cristal violeta se trasladaron a una hoja de cálculo Microsoft Excel y se calculó la media y la desviación estándar (DS) de los 4 ensayos independientes, y se representaron los datos con el mismo programa.

Se fotografiaron fenotipos de biofilms representativos de las 276 cepas utilizando un teléfono móvil Realme o una cámara Canon EOS 80D.

Ensayos de inhibición de Quorum-Sensing

Para los ensayos de inhibición de Quorum-Sensing se utilizó la cepa de la Colección Española de Cultivos Tipo *Chromobacterium violaceum* CECT 494 T. Como control de la producción de moléculas de Quorum-Sensing se utilizó la cepa *Chromobacterium violaceum* CV0Blu que no produce el pigmento violaceína de forma espontánea.

Para el ensayo, se descongelaron 4 librerías que contenían las 276 cepas aisladas en las instalaciones de ECOAQUA.

El ensayo se realizó en placas de 15 cm de diámetro con medio LB Agar. Sobre éstas, se sembró un césped confluyente de cada cepa reportera de *C. violaceum* mediante esferas de vidrio. Tras 30 minutos de incubación a 27°C, se inocularon spots de 5 µL de cada cepa bacteriana (96 spots/placa) y se incubaron las placas durante 48 horas a 27°C. Tras este periodo de cocultivo, se fotografiaron las placas y se anotaron los fenómenos de inhibición del pigmento violaceína por la cepa de *C. violaceum* CECT 494 T. Un resultado positivo para la inhibición de moléculas d Q-S se anotó tras la aparición de un halo blanco sobre la bacteria del césped. Un resultado de antibiosis positivo se anotó como la inhibición del crecimiento de la bacteria del césped.

Experimentos de inducción de fagos con Mitomicina C

Para la inducción de fagos líticos se utilizó el protocolo descrito por Raya y H'bert (Raya and H'bert, 2009), y por Livny y colaboradores (Livny et al., 2009). Como inductor de fagos se utilizó la Mitomicina C, un *crosslinker* de ADN aislado de la actinobacteria *Streptomyces caespitosus* (M4287, Sigma-Aldrich, España), cuya fórmula empírica es $C_{15}H_{18}N_4O_5$ y tiene un peso molecular de 334.33. Este compuesto se utilizó a una concentración stock de 1 mg/mL y a una concentración final en los cultivos de bacterias de entre 0.5 y 1 microgramos/mL. Para calcular la concentración de Mitomicina C en las cepas aisladas en las instalaciones de ECOAQUA, se realizaron curvas de crecimiento con varias cepas al azar, para ver cómo afectaba la Mitomicina C durante el crecimiento. La concentración final utilizada para los experimentos se estableció tras estos ensayos en 1 microgramo/mL.

Para realizar las curvas de crecimiento se cultivaron las bacterias en medio líquido y se inocularon pocillos de placas de 24 pocillos que contenían 1 mL de medio LB. El inóculo consistió en 10 microlitros de una suspensión de bacterias para conseguir una densidad óptica inicial en el cultivo de entre 0.05 y 0.1. Las placas se introdujeron en el sistema Varioskan LUX y se inició el mismo protocolo para las 192 cepas. Este consistió en una cinética de agitación continua de velocidad 120 rpm y fuerza de agitación media, a 27°C con lectura de la DO 600nm (DO₆₀₀) cada 20 minutos. Se programó el sistema para realizar lecturas durante 7 horas. Aproximadamente, entre la quinta y la sexta hora de cultivo, tiempo en el que la mayoría de bacterias ya habían iniciado la fase exponencial, se introdujo una pausa para inocular los pocillos con la Mitomicina C. Tras el pulso de Mitomicina C, el sistema se programó para continuar otras 18 horas de cultivo. En la mayoría de casos, tras 6 horas con Mitomicina C ya se pudo detener la agitación para observar los resultados. Los datos de DO₆₀₀ se trasladaron a una hora de cálculo y se generó automáticamente una gráfica con las curvas de crecimiento. Los experimentos se realizaron un mínimo de 2 veces con cada una de las 192 cepas. Si se observaron discrepancias entre los dos ensayos, se realizó un tercer ensayo, que se tomó como definitivo. Como control de contaminación se inocularon pocillos en las placas que contenían únicamente medio LB. Los datos brutos de lecturas fueron procesados directamente mediante el software SkanIt RE versión 7.0 y se trasladaron a gráficas compatibles con el software Microsoft Excel.

En algunos casos, se fotografiaron desde el plano cenital, algunos de los pocillos de las placas utilizadas tras la inducción con Mitomicina C, utilizando un teléfono móvil Realme 7.

Secuenciación de cepas con propiedades inhibitorias de patógenos de peces

De todas las cepas estudiadas, se seleccionaron finalmente 8 que presentaron actividad antimicrobiana contra patógenos de peces. La secuenciación masiva (NGS) de los genomas bacterianos se realizó mediante la tecnología por síntesis en paralelo de Illumina, utilizando para ello una plataforma MiSeq con un kit v3 de 2x300 pb. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el paquete bioinformático TORMES v.1.2.

[GitHub - nmquijada/tormes: Making whole bacterial genome sequencing data analysis easy](https://github.com/nmqijada/tormes)

(Quijada et al., 2019), que incluye a su vez las bases de datos y software:

Abricate, BLAST, FastTree, Kraken, Mauve, Parallel, Prinseq, Prokka, QUAST, R, Roary, roary2svg, ResFinder, SPAdes, y Trimmomatic.

Se utilizó el servidor RAST de manera manual para identificar los subsistemas dentro de los genomas (Aziz et al., 2008) que pertenecían a las categorías: Cofactores, producción de vitaminas, producción de pigmentos; pared celular y cápsulas; virulencia; metabolismo de potasio; fotosíntesis; fagos, profagos, transposones y plásmidos; transporte en la membrana; adquisición de hierro y metabolismo del hierro; metabolismo de ARN; nucleótidos y nucleósidos; metabolismo de proteínas; división y ciclo celular; movilidad y quimiotaxis; regulación y señalización celular; metabolismo secundario; metabolismo de ADN; metabolismo de ácidos grasos, lípidos, e isoprenoides; metabolismo del nitrógeno; dormancia y esporulación; respiración; respuesta a estrés; metabolismo y compuestos aromáticos; metabolismo de aminoácidos; metabolismo del azufre; metabolismo de fósforo; metabolismo de hidratos de carbono.

Para la búsqueda de genes de resistencia a antibióticos, se utilizó Resfinder (Zankari et al., 2012), CARD (McArthur et al., 2013), y ARG-ANNOT (Gupta et al., 2014) utilizando Abricate. Si la búsqueda arrojó una identidad menor del 90% el resultado fue desechado. Para la búsqueda de genes de virulencia se utilizó la base de datos Virulence Factors Data Base (VFDB) (Chen et al., 2005) utilizando Abricate. Si la búsqueda arrojó una identidad menor del 90% el resultado fue desechado.

Los genomas de fagos encontrados en las bacterias seleccionadas se analizaron mediante el programa PHASTER (Phage Search Tool Enhanced Release) (Arndt et al., 2016) (Zhou et al., 2011).

Fotografía y Microscopía Electrónica de Transmisión

Para las fotografías de placas y colonias se utilizaron teléfonos iPhone 6 y Realme 7 con cámara principal de 8 y 48 Megapíxeles respectivamente.

Para algunas placas y colonias se utilizó también una cámara Canon EOS 70D con objetivo Sigma DG Macro HSM de 105 mm y apertura máxima de 2.8.

Para la microscopía electrónica de bacterias y fagos se utilizó un microscopio electrónico de transmisión (TEM) del Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL), modelo JEOL (JEM-1011) equipado con una cámara ORIUS SC 1000 CCD (GATAN) y trabajando a 80 kV de potencia. En este caso, las preparaciones en fresco de bacterias o de fagos se colocaron sobre rejillas de cobre y carbono cubiertas con formvar (200 mesh) y se dejaron secar al aire durante un minuto. Posteriormente se tiñeron negativamente con ácido fosfotúngstico al 1^a en agua destilada estéril durante 2 segundos. El exceso de ácido fosfotúngstico se secó por capilaridad utilizando un papel de filtro. Finalmente, las rejillas se dejaron secar al aire y se almacenaron hasta su observación.

Resultados

Resultados

Aislamiento de bacterias en las instalaciones de ECOAQUA

Tras el cribado de cepas procedentes de las instalaciones de ECOAQUA, se aislaron un total de 276 colonias bacterianas con fenotipos diferentes, procedentes de todas las muestras recogidas, tanto de sustratos sólidos como de agua, y que mostraron buen crecimiento en medios generales, además de no presentaron pérdida de viabilidad tras la congelación a -80°C .

La figura 3 muestra algunas placas con el crecimiento de cepas aisladas en las instalaciones de ECOAQUA a partir de las cuales se seleccionaron las colonias que denominaremos “colonias test”.

En alguna muestra (Figura 3A), aparecieron colonias de crecimiento muy rápido, que fueron descartadas para su posterior utilización, pues en un ensayo de 48 horas el solapamiento con otras colonias sería evidente, pudiendo enmascarar un efecto antagonista de algunas de ellas.

No se anotó el número de colonias de forma, tamaño o color similares.

En muchos casos, se utilizaron diluciones seriadas para reaislar cepas ya que la densidad de las poblaciones en algunos puntos de muestreo era muy alta (Figura 3B-C). Además, en algunos casos, fue evidente el solapamiento de colonias, por lo que fue necesario aislar colonias a partir de mezclas heterogéneas.

Después de la selección inicial, las cepas se cultivaron en placas con 9-12 cuadrantes donde se estudió la morfología de las colonias aisladas. Aquí se volvió a realizar una selección para descartar colonias repetidas presentes en la misma muestra. Un ejemplo de esta siembra individual se muestra en la figura 3D.

Figura 3.

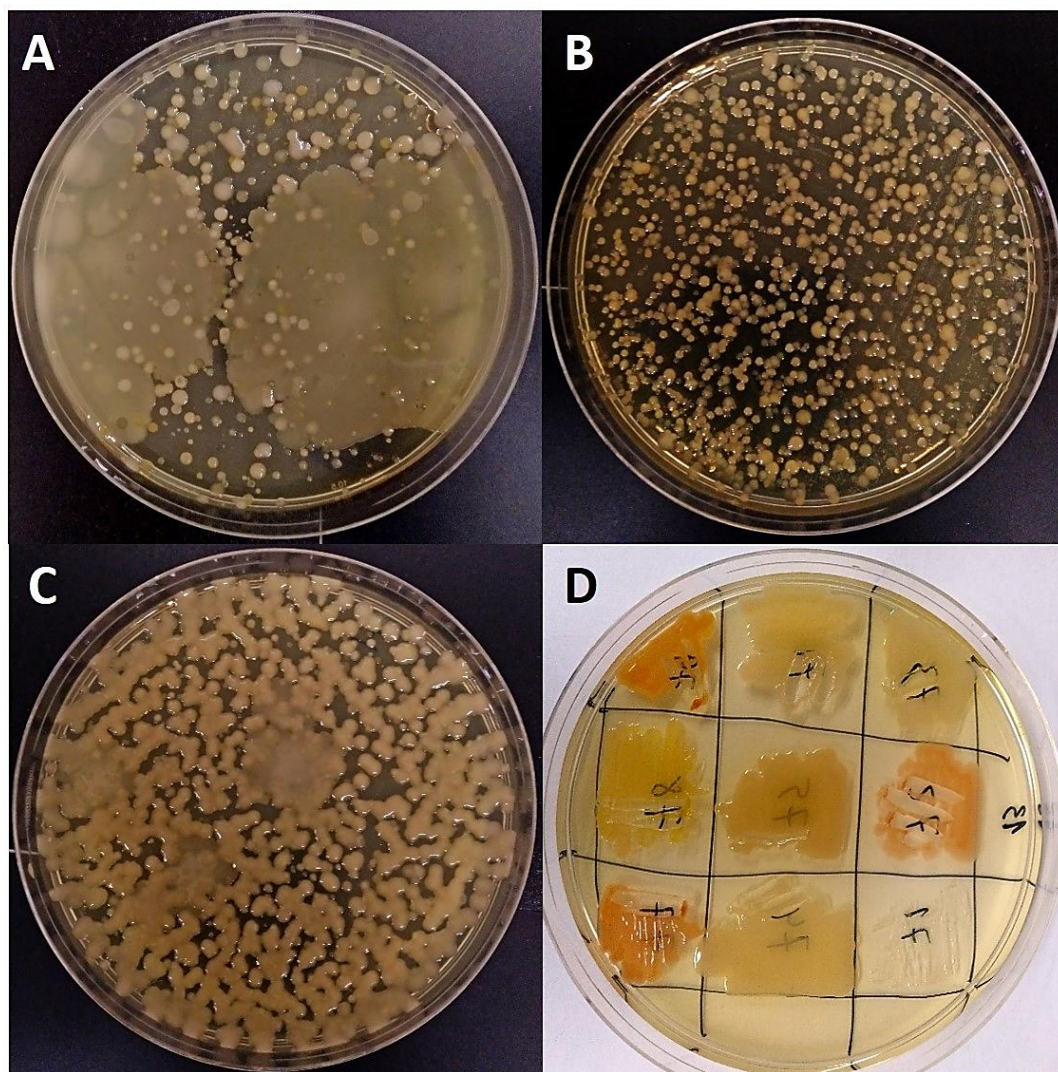


Figura 3. Ejemplos de placas utilizadas para el aislamiento y la selección de colonias de bacterias aisladas en las instalaciones de ECOAQUA. A-C: cultivos primarios de colonias aisladas de las muestras iniciales. D: Selección de colonias de morfología diferente.

Estudios de antagonismo frente a patógenos de peces Gram positivos y Gram negativos

Las bacterias aisladas de las instalaciones de ECOAQUA se enfrentaron en ensayos de antagonismo a distintas cepas de las especies de patógenos de peces: *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*, *S. iniae* y *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Las figuras 4-13 muestran ensayos representativos de antagonismo, utilizando placas de 15 cm de diámetro, con medio LB (*A. hydrophila* y *Y. ruckeri*) o BHIB (*S. iniae* y *P. damsela* subsp. *piscicida*). Inicialmente se inoculó *S. iniae* sobre medio TSB, pero posteriormente se comprobó que el medio más adecuado para el crecimiento era BHIB. En medio líquido por ejemplo, casi todas las cepas mostraban un comportamiento agregativo a la hora de crecer, lo cual dificulta su dispersión homogénea sobre las placas para crear un césped. Esto ocurría en menor medida en BHIB.

Figura 4.

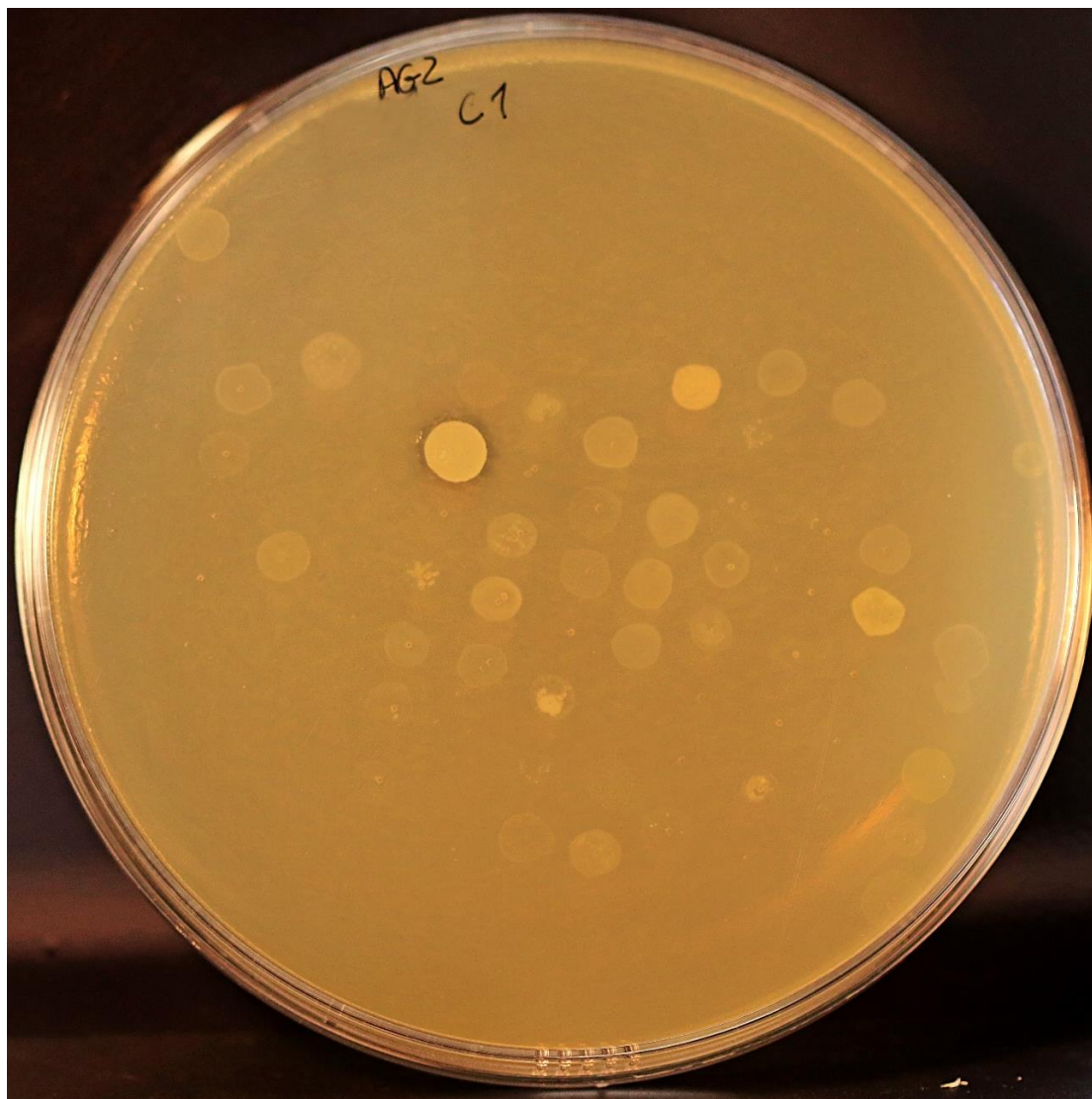


Figura 4. Antagonismo de cepas test procedentes de biofilms y de sedimentos frente a la cepa AG2 de *Aeromonas hydrophila*

Figura 5.

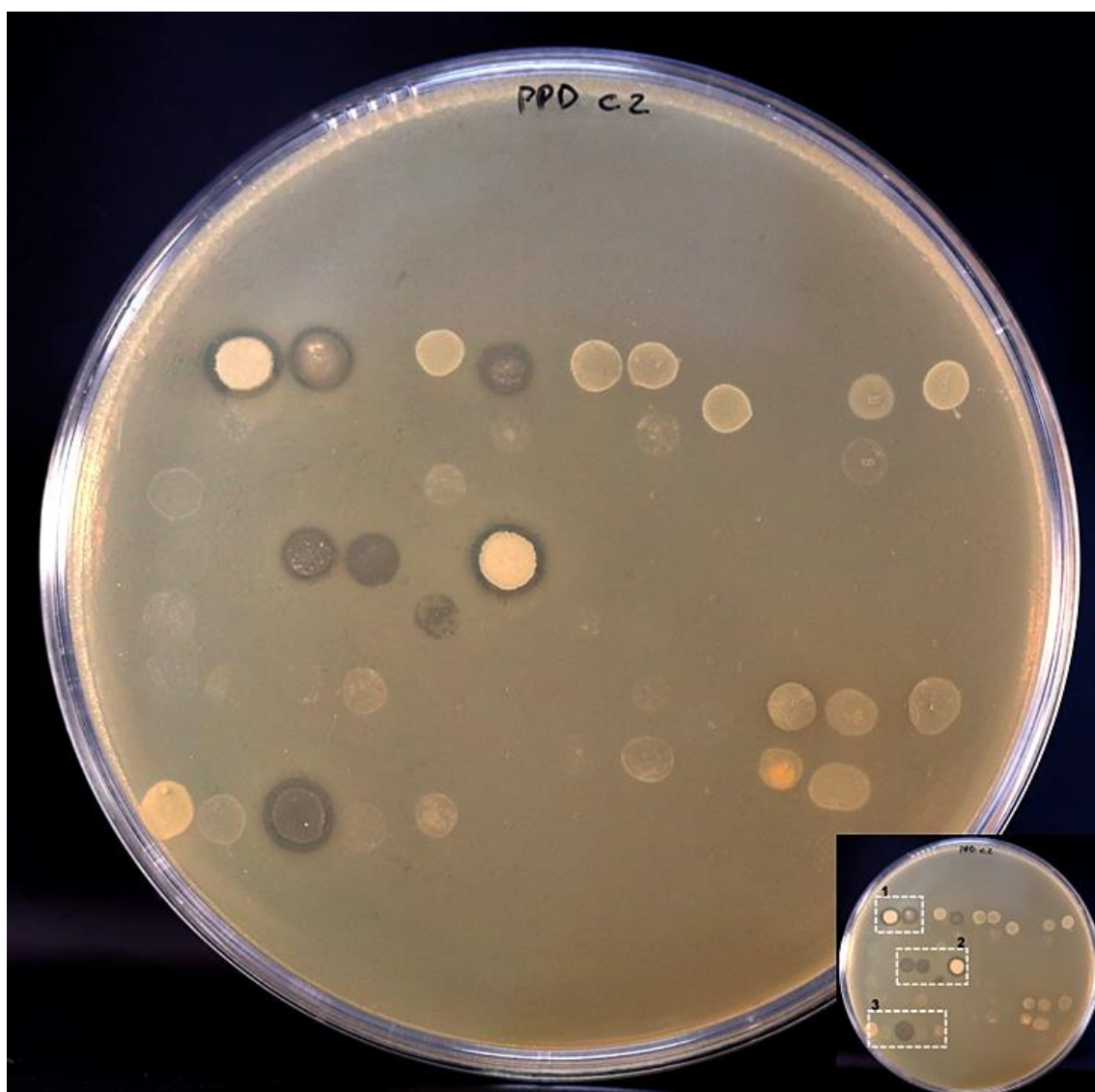


Figura 5. Antagonismo de cepas test procedentes de biofilms y de sedimentos frente a la cepa PPD de *Aeromonas hydrophila*. En la parte inferior derecha se señalan las 3 zonas ampliadas en la figura 5B.

Figura 5B.

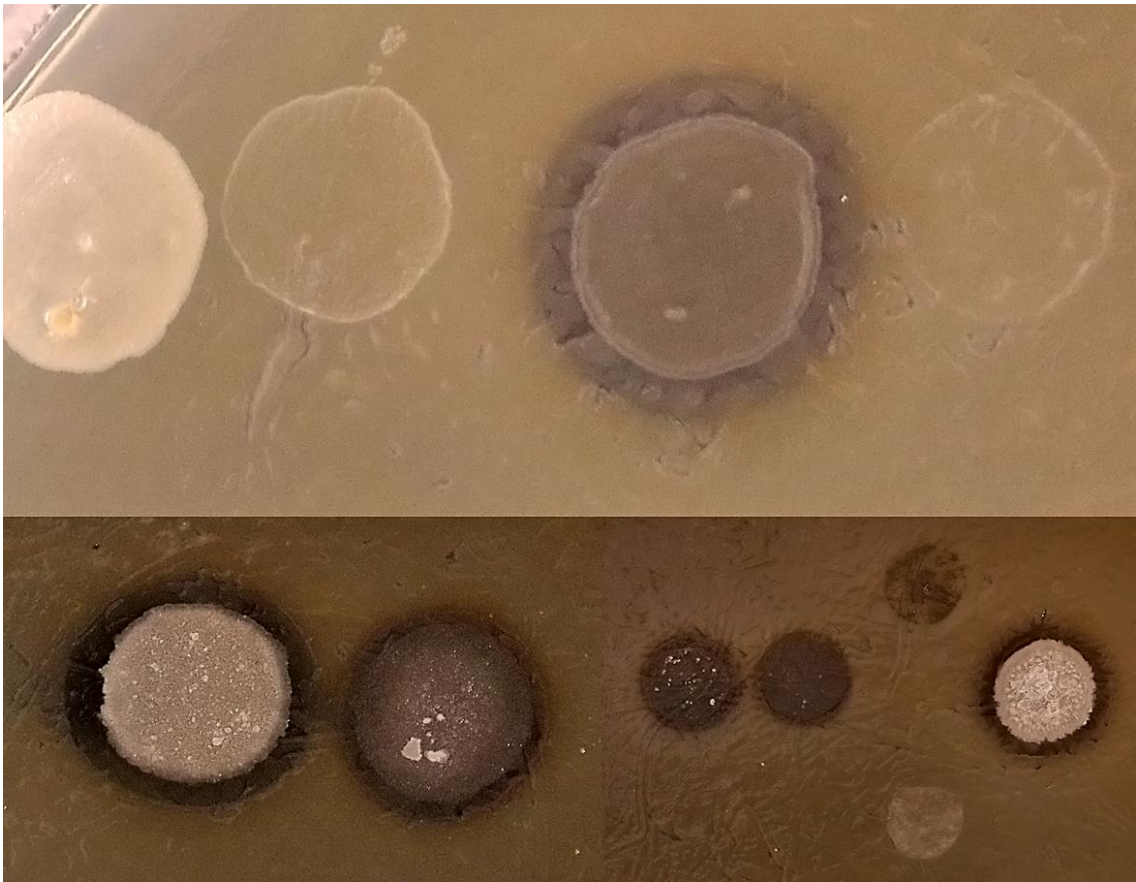


Figura 5B. Partes ampliadas de las áreas señaladas en la figura 4. Halos de inhibición de bacterias test procedentes de biofilms y de sedimentos frente a la cepa PPD de *A. hydrophila*.

Las figuras 6- muestran ensayos de antagonismo frente a cepas de *Y. ruckeri*. Las figuras 6 y 7 muestran distintas muestras de bacterias frente a la misma cepa de *Y. ruckeri*, la cepa 94/05, mientras que las figura 8 muestra distintas cepas de *Y. ruckeri* frente a las mismas bacterias test.

Figura 6.

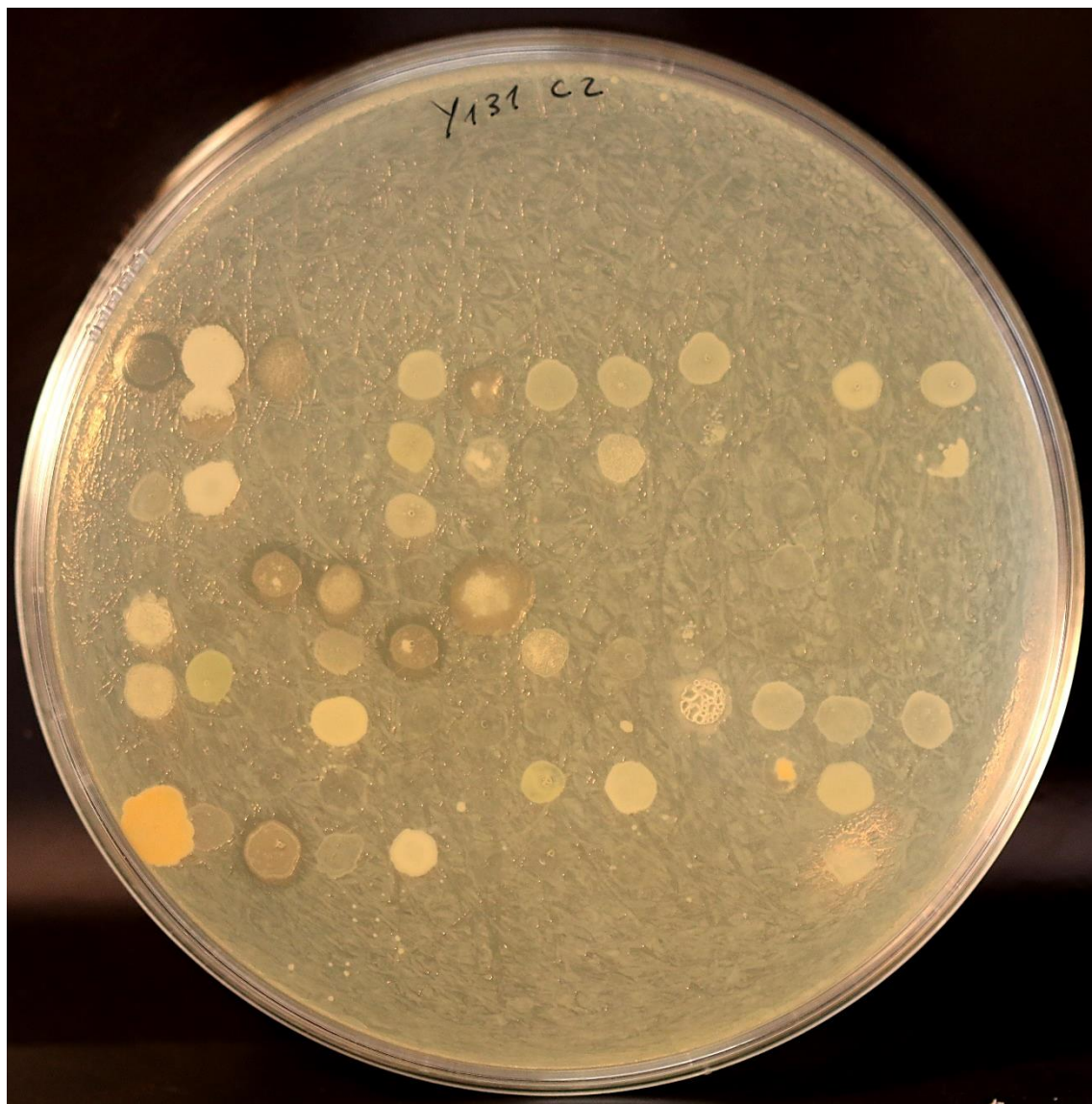


Figura 6. Antagonismo de cepas test procedentes de biofilms y de sedimentos de tanques de cultivo de dorada frente a la cepa de *Y. ruckeri* 94/05.

Figura 7.

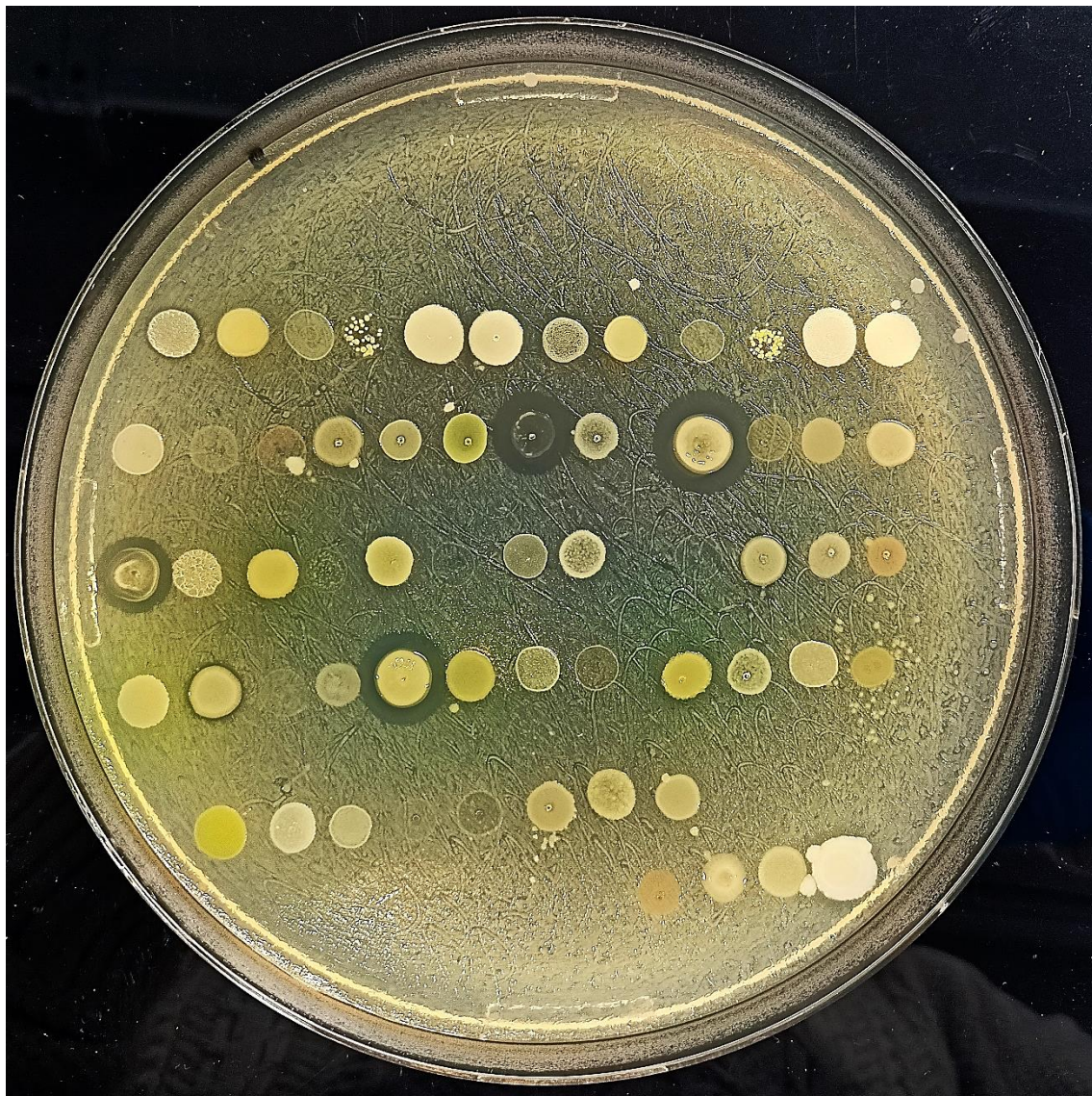


Figura 7. Antagonismo de cepas test procedentes de agua de tanques de cultivo de dorada frente a la cepa de *Y. ruckeri* CECT 955.

Figura 8.

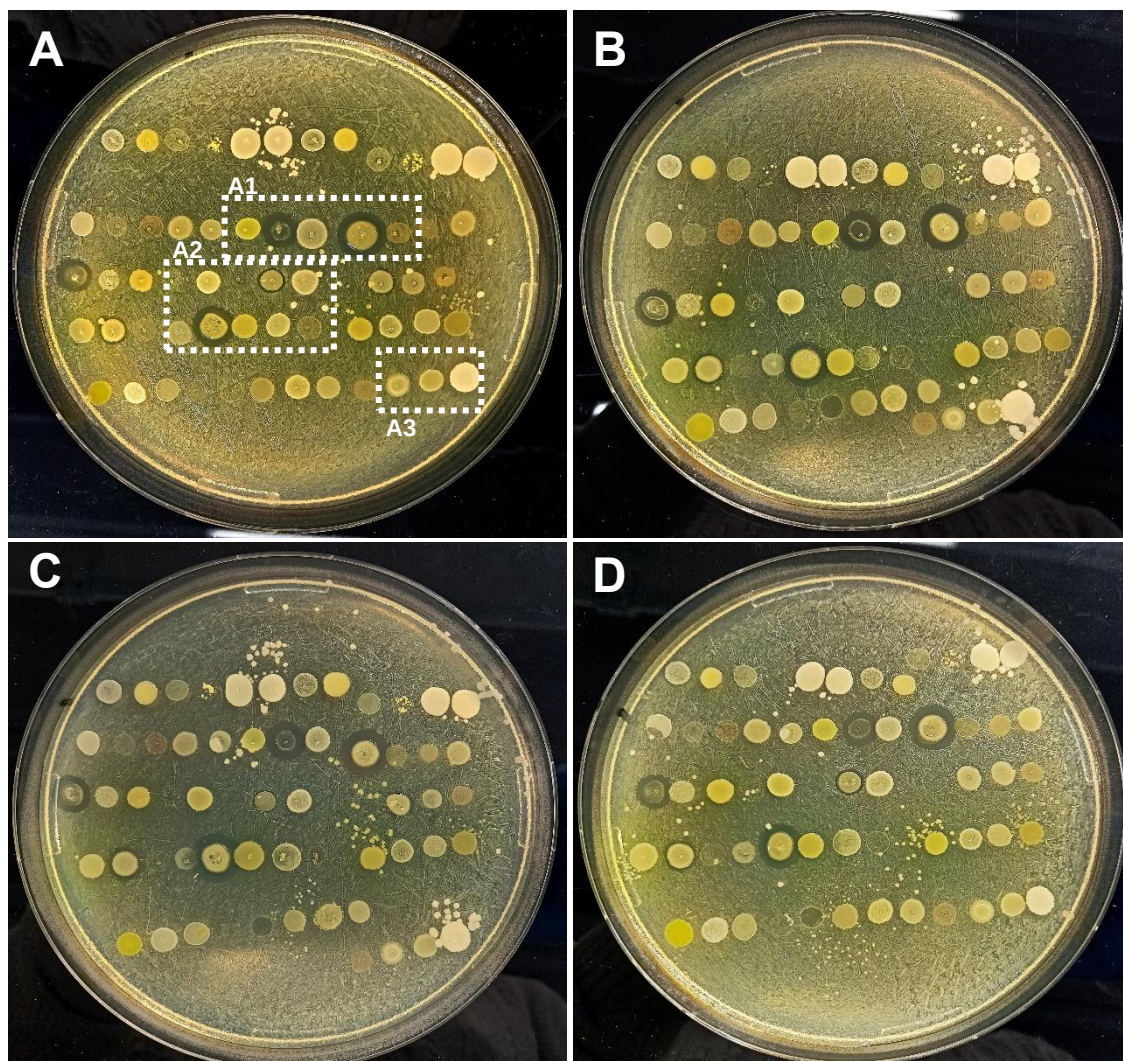


Figura 8. Antagonismo de las mismas cepas test procedentes de agua de tanques de dorada frente a las cepas de *Y. ruckeri*; A, CECT-955; B, UL-1; C, ppi661; D, UL-250.

En la figura 9 se muestran algunos ejemplos a mayor aumento de la inhibición de las cepas de *Y. ruckeri*.

Figura 9.

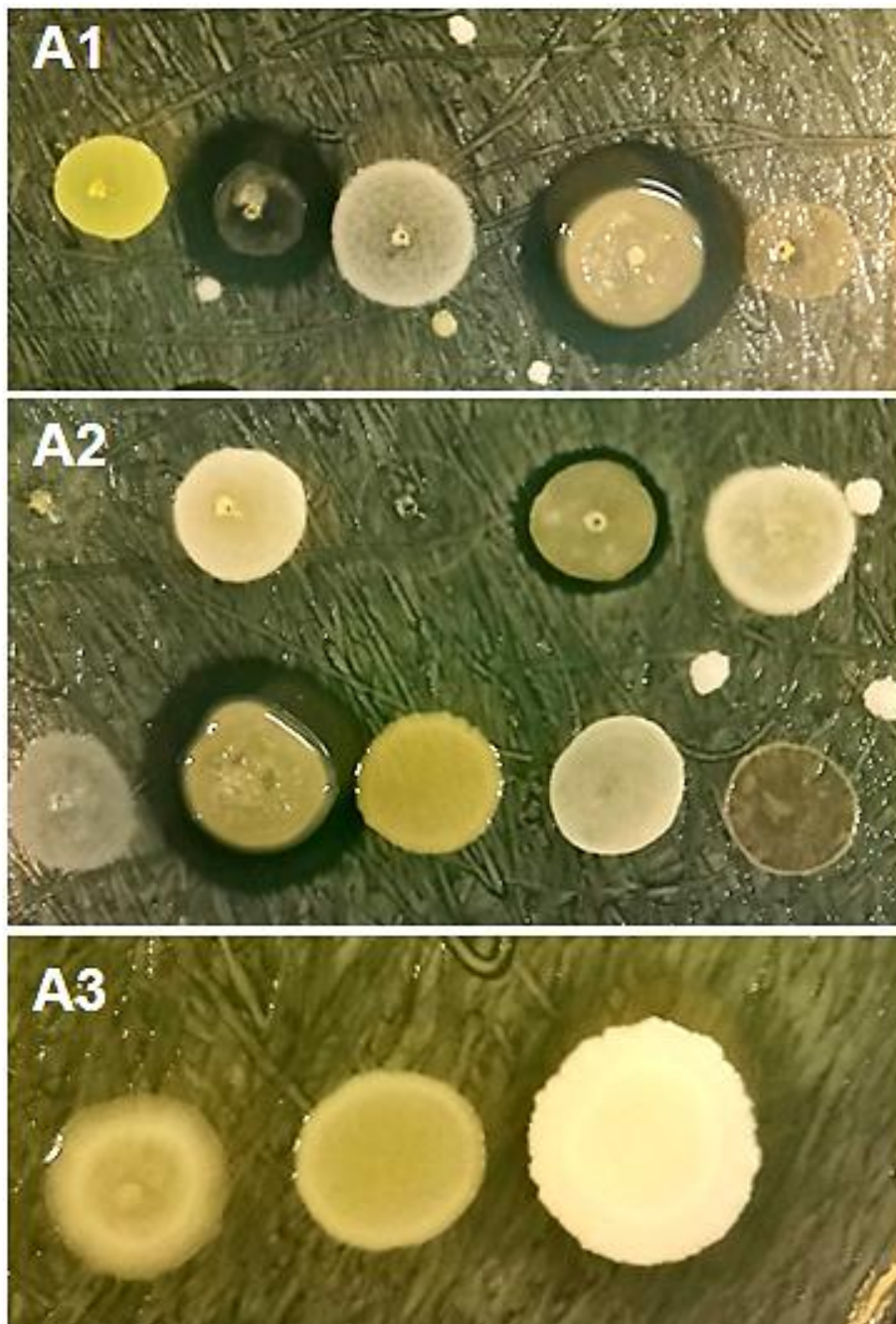


Figura 9. Ampliación de las zonas punteadas en la figura 9. Halos de inhibición de distintas cepas test procedentes de agua de tanques de dorada frente a *Y. ruckeri* CECT-955.

Figura 10.

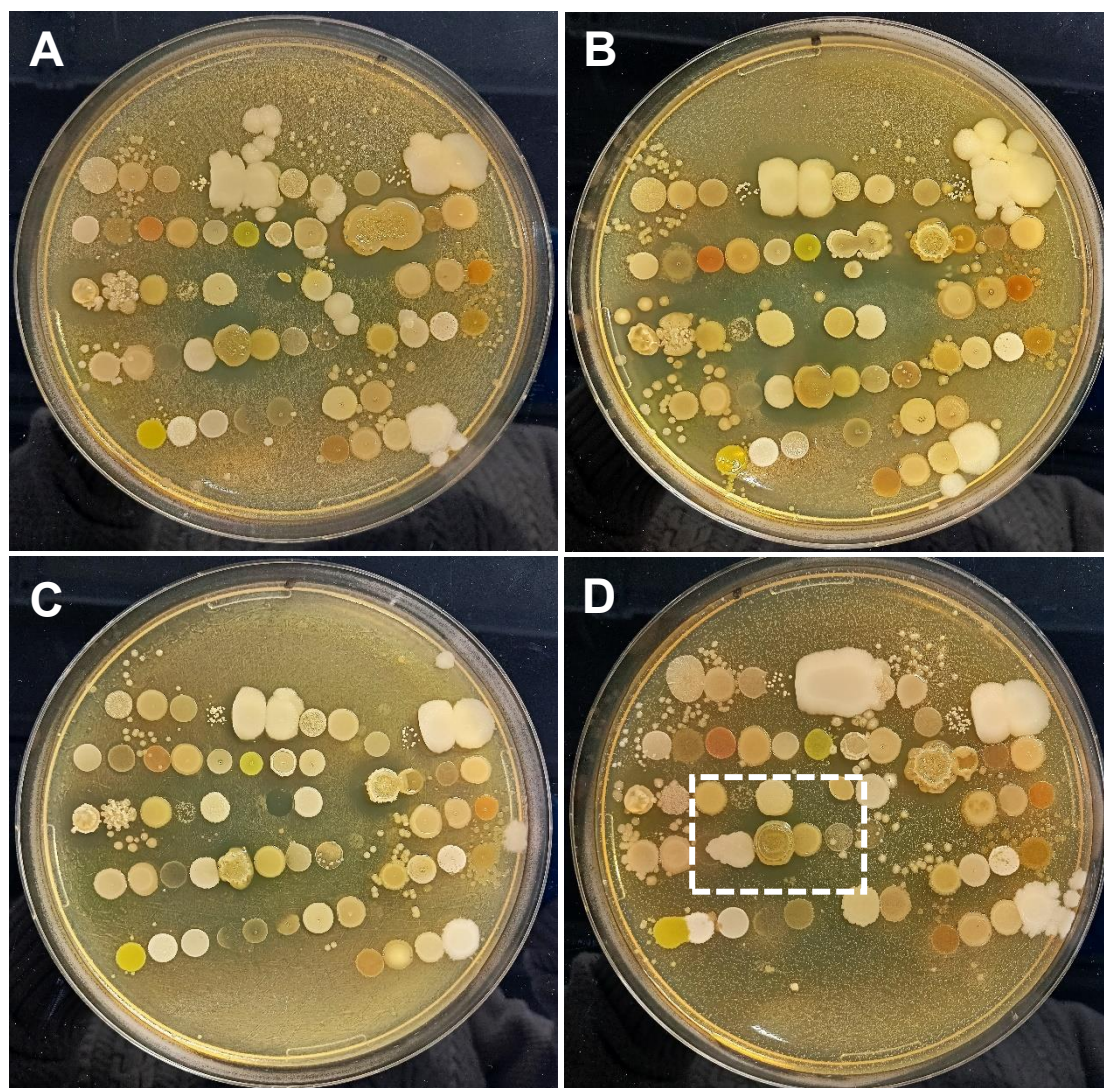


Figura 10. Antagonismo de las mismas cepas test procedentes de agua de tanques de dorada frente a las cepas de *S. iniae*; A, CIP 102508; B, 103769; C, CIP 105804; D, IUSA-1.

Una ampliación de la zona punteada se muestra en la figura 10 B.

Figura 10 B.



Figura 10 B. Ampliación de las zonas punteadas en la figura 9D. Halos de inhibición de distintas cepas test procedentes de agua de tanques de dorada frente a *S. iniae* IUSA-1.

Figura 11.

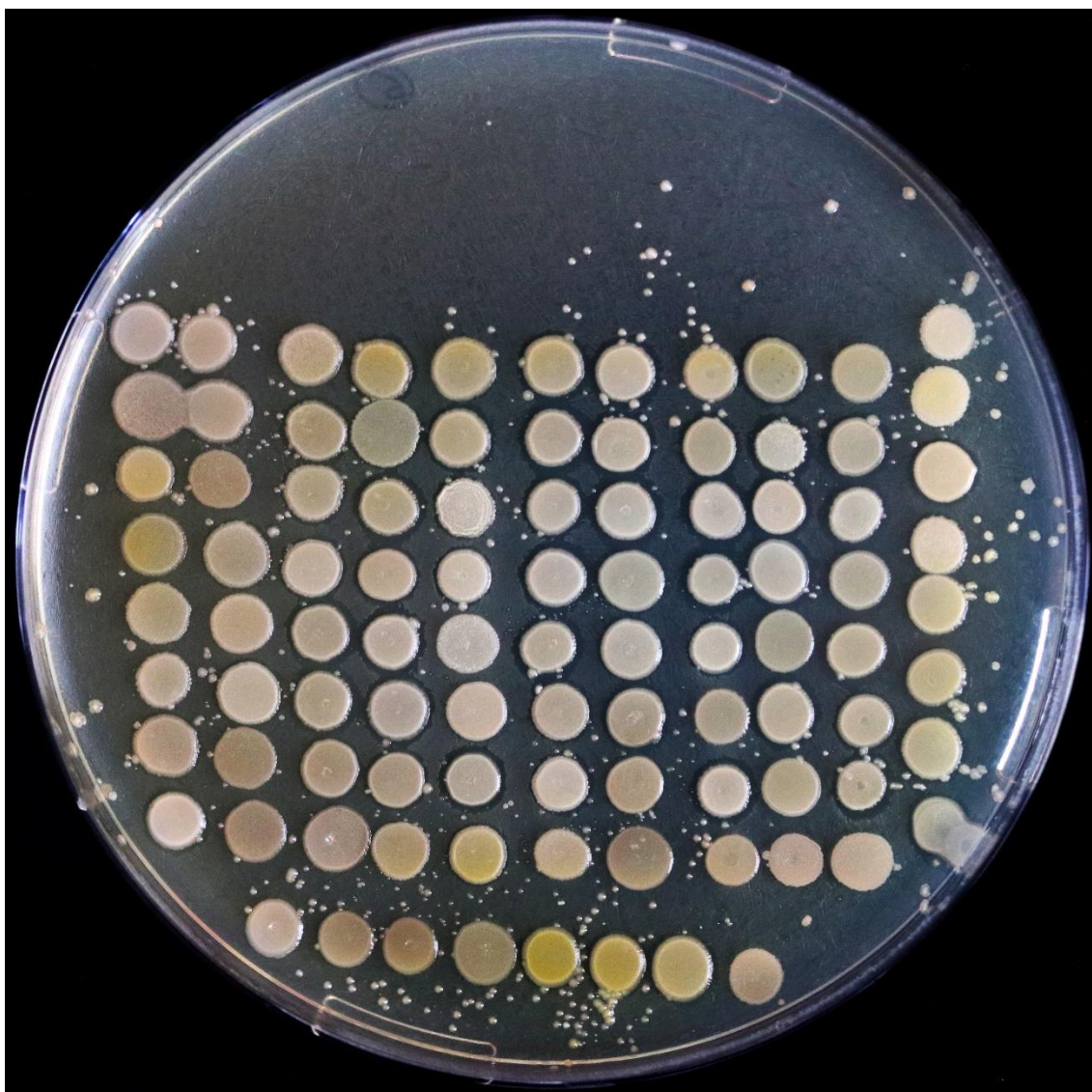


Figura 11. Antagonismo de cepas test procedentes de biofilms y de sedimentos frente a la cepa de *S. iniae* nº1.

Un detalle del centro de la placa, filas 2 a 7 y columnas 3 a 7 se muestra en la figura 11B.

Figura 11 B.



Figura 11B. Ampliación de las zona central de la figura 11. Antagonismo de cepas test procedentes de biofilms y de sedimentos frente a la cepa de *S. iniae* CIP 102508.

Figura 12.

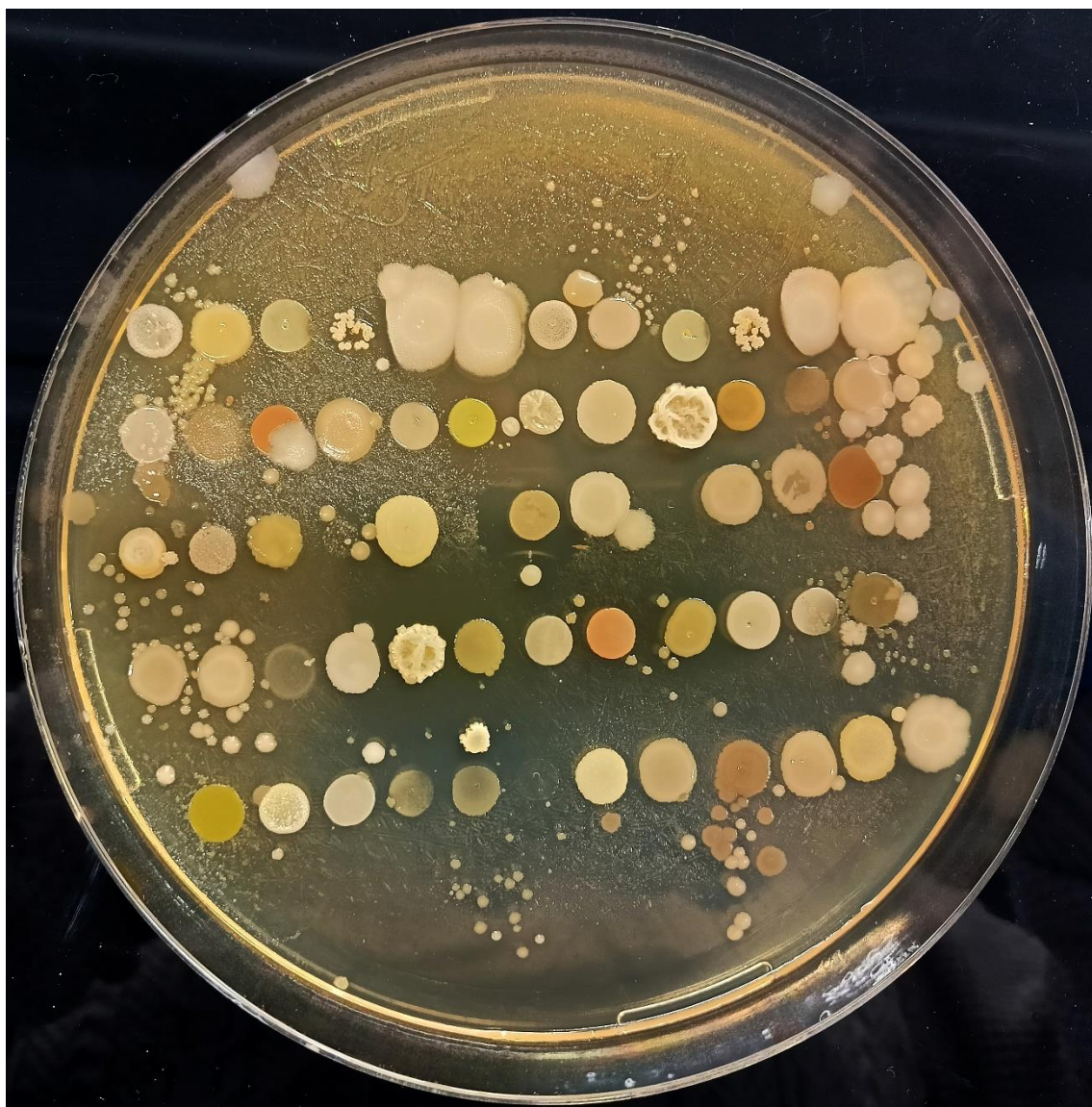


Figura 12. de cepas test procedentes de agua de estanque de lubina frente a la cepa de *P. damselae* subsp. *piscicida* 94/99.

Figura 13.

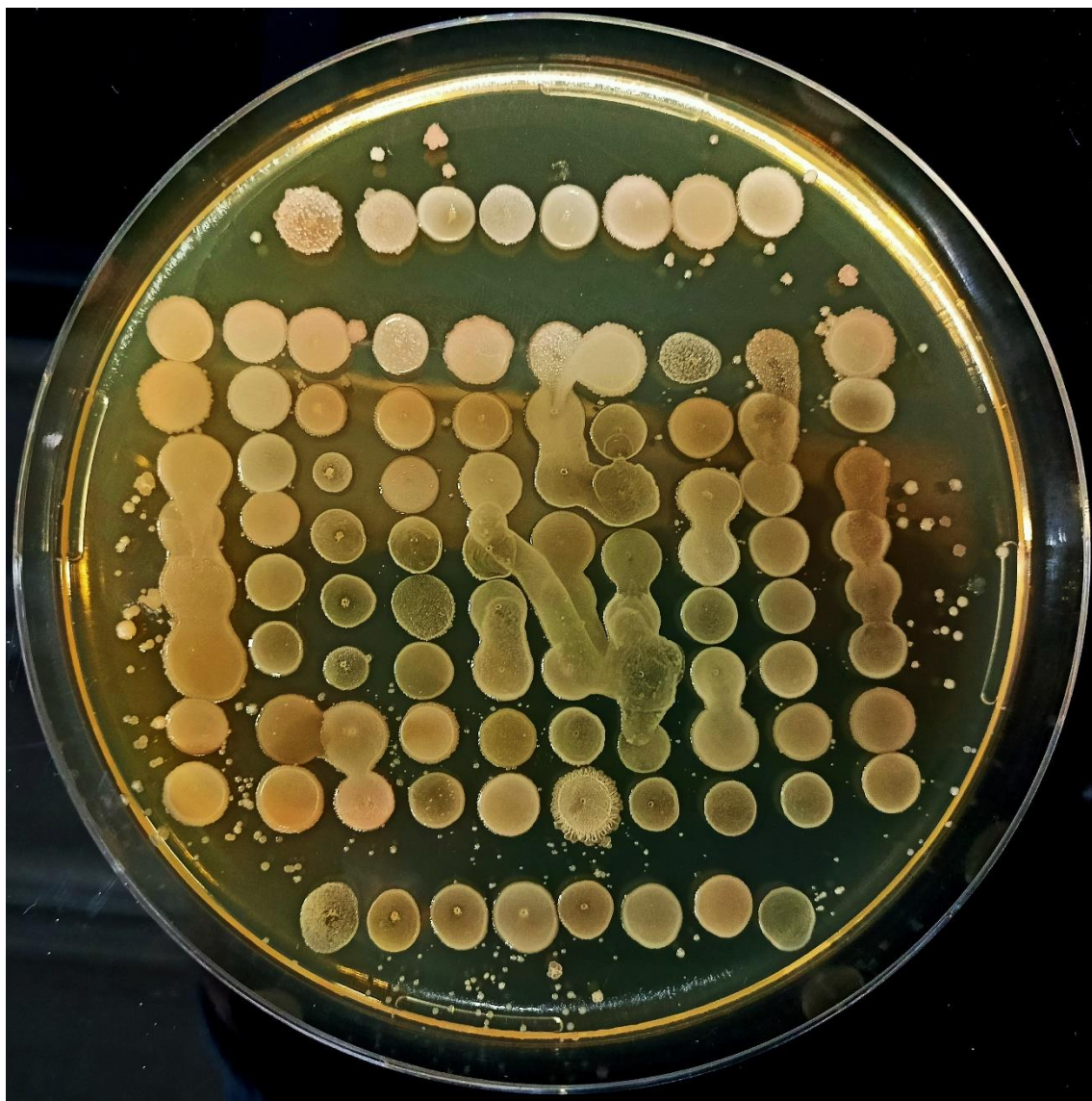


Figura 13. de cepas test procedentes de biofilms y lodos frente a la cepa de *P. damsela* subsp. *piscicida* 94/99.

La **tabla 2** muestra el resultado semicuantitativo de todos los ensayos. Se denominó colonia TEST a la colonia aislada de las instalaciones de ECOAQUA. La actividad antagonista frente a patógenos de peces se clasificó como:

Nula (-): si no apareció halo de inhibición alrededor de la bacteria test.

Débil (+): cuando los halos de inhibición fueron de un tamaño de 1 mm o menos alrededor de la colonia test.

Moderada (++): cuando los halos de inhibición fueron de un tamaño entre 1 y 3 mm de diámetro alrededor de la colonia test.

Fuerte (+++): cuando los halos de inhibición fueron de más de 3 mm de diámetro alrededor de la colonia test.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana de las cepas test frente a patógenos de peces y *C. violaceum*.

CEPA TEST																														
Patógeno	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
A. hydrophila AG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A. hydrophila PPD70/91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y. ruckeri CECT-955	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y. ruckeri UL-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y. ruckeri UL-ppi 661	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y. ruckeri 94/05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y. ruckeri UL-250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. iniae CIP 102508	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. iniae (n°2) CIP 103769	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S. iniae (n°3) CIP 105804	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S. iniae (n°4) IUSA-1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
P. damsela s. piscicida 94/99	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
C. violaceum CECT-494 T	-	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	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
A. hydrophila AG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A. hydrophila PPD70/91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y. ruckeri CECT-955	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y. ruckeri UL-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y. ruckeri UL-ppi 661	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y. ruckeri 94/05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y. ruckeri UL-250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. iniae CIP 102508	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
S. iniae CIP 103769	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
S. iniae CIP 105804	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S. iniae IUSA-1	+	+	+	-	-	-	+++	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
P. damsela s. piscicida 94/99	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	++	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
C. violaceum CECT-494 T	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	++	-	-

Tabla 2 continuación.

Patógeno	CEPA TEST																													
	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
<i>A. hydrophila</i> AG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. hydrophila</i> PPD70/91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> CECT-955	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> UL-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> UL-ppi 661	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> 94/05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> UL-250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. iniae</i> CIP 102508	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. iniae</i> CIP 103769	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. iniae</i> CIP 105804	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>S. iniae</i> IUSA-1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>P. damselae s. piscicida</i> 94/99	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>C. violaceum</i> CECT-494 T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
<i>A. hydrophila</i> AG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. hydrophila</i> PPD70/91	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> CECT-955	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> UL-1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> UL-ppi 661	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> 94/05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> UL-250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. iniae</i> CIP 102508	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. iniae</i> CIP 103769	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>S. iniae</i> CIP 105804	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>S. iniae</i> IUSA-1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	++	+	+
<i>P. damselae s. piscicida</i> 94/99	++	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	++	-	+++	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>C. violaceum</i> CECT-494 T	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

Tabla 2 continuación

CEPA TEST																															
Patógeno	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	
<i>A. hydrophila</i> AG2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>A. hydrophila</i> PPD70/91	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Y. ruckeri</i> CECT-955	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Y. ruckeri</i> UL-1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Y. ruckeri</i> UL-ppi 661	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Y. ruckeri</i> 94/05	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Y. ruckeri</i> UL-250	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. iniae</i> CIP 102508	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	
<i>S. iniae</i> CIP 103769	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>S. iniae</i> CIP 105804	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	
<i>S. iniae</i> IUSA-1	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
<i>P. damsela</i> s. <i>piscicida</i> 94/99	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	
<i>C. violaceum</i> CECT-494 T	-	-	-	++	+	-	-	-	-	+	-	-	+	++	+	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	
<i>A. hydrophila</i> AG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>A. hydrophila</i> PPD70/91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Y. ruckeri</i> CECT-955	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Y. ruckeri</i> UL-1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Y. ruckeri</i> UL-ppi 661	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Y. ruckeri</i> 94/05	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Y. ruckeri</i> UL-250	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. iniae</i> CIP 102508	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	
<i>S. iniae</i> CIP 103769	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
<i>S. iniae</i> CIP 105804	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	++	+	-	++	-	+	+	+	
<i>S. iniae</i> IUSA-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>P. damsela</i> s. <i>piscicida</i> 94/99	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	
<i>C. violaceum</i> CECT-494 T	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

CEPA TEST																														
Patógeno	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
<i>A. hydrophila</i> AG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. hydrophila</i> PPD70/91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> CECT-955	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> UL-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> UL-ppi 661	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> 94/05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> UL-250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. iniae</i> CIP 102508	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. iniae</i> CIP 103769	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. iniae</i> CIP 105804	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. iniae</i> IUSA-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. damsela</i> s. <i>piscicida</i> 94/99	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. violaceum</i> CECT-494 T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
<i>A. hydrophila</i> AG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>A. hydrophila</i> PPD70/91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> CECT-955	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> UL-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> UL-ppi 661	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> 94/05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> UL-250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>S. iniae</i> CIP 102508	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	++	++	-	-
<i>S. iniae</i> CIP 103769	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	++	++	-	-
<i>S. iniae</i> CIP 105804	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	++	++	-	-
<i>S. iniae</i> IUSA-1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	++	++	-	-
<i>P. damsela</i> s. <i>piscicida</i> 94/99	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	++	-	-	-	-	+	+	++	-	-	-
<i>C. violaceum</i> CECT-494 T	-	-	+++	-	-	-	++	++	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CEPA TEST																														
Patógeno	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
<i>A. hydrophila</i> AG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. hydrophila</i> PPD70/91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> CECT-955	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> UL-1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> UL-ppi 661	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> 94/05	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i> UL-250	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. iniae</i> CIP 102508	++	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. iniae</i> CIP 103769	++	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. iniae</i> CIP 105804	++	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. iniae</i> IUSA-1	++	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. damsela</i> s. <i>piscicida</i> 94/99	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. violaceum</i> CECT-494 T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	271	272	273	274	275	276																								
<i>A. hydrophila</i> AG2	-	-	-	-	-	-																								
<i>A. hydrophila</i> PPD70/91	-	-	-	-	-	-																								
<i>Y. ruckeri</i> CECT-955	-	-	-	-	-	+																								
<i>Y. ruckeri</i> UL-1	-	-	-	-	-	+																								
<i>Y. ruckeri</i> cepa UL-ppi 661	-	-	-	-	-	+																								
<i>Y. ruckeri</i> 94/05	-	-	-	-	-	+																								
<i>Y. ruckeri</i> UL-250	-	-	-	-	-	+																								
<i>S. iniae</i> CIP 102508	+	-	-	-	-	-																								
<i>S. iniae</i> CIP 103769	+	-	-	-	-	-																								
<i>S. iniae</i> CIP 105804	+	-	-	-	-	-																								
<i>S. iniae</i> IUSA-1	+	-	-	-	-	-																								
<i>P. damsela</i> s. <i>piscicida</i> 94/99	-	-	-	-	-	-																								
<i>C. violaceum</i> CECT-494 T	-	-	-	-	-	-																								

Estudios de antagonismo frente a *C. violaceum*

Para detectar actividad antagonista frente a *C. violaceum*, o actividad anti-QS, se utilizaron también ensayos de antagonismo utilizando placas de 15 cm de diámetro, sembrando en césped la cepa de *C. violaceum* productora de pigmento violaceína. Las cepas aisladas en las instalaciones de ECOAQUA se depositaron del mismo modo que en los ensayos contra patógenos de peces.

Las figuras 14 a 17 muestran ejemplos representativos de ensayos de inhibición de las cepas aisladas de las instalaciones de ECOAQUA frente a *C. violaceum*.

En la tabla 2 se recogen también los resultados semicuantitativos de estos ensayos. Se denominó colonia TEST a la colonia aislada de las instalaciones de ECOAQUA. La actividad antagonista frente a *C. violaceum* se clasificó como **Nula (-)**, **Débil (+)**, **Moderada (++)**, o **Fuerte (+++)**, del mismo modo que en los ensayos de inhibición de patógenos.

Figura 14.

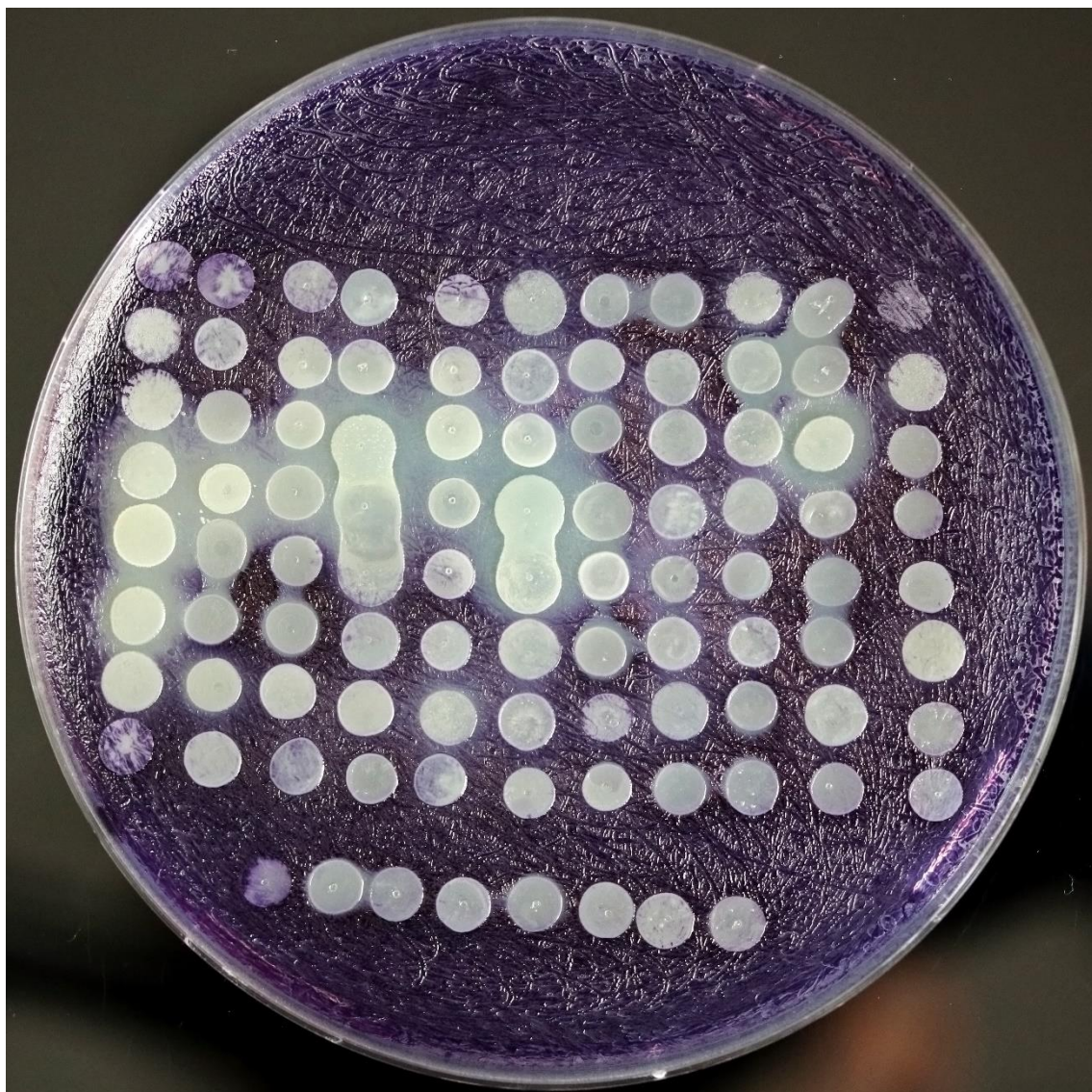


Figura 14. Actividad de distintas cepas aisladas de biofilms o de lodos frente a *C. violaceum* cepa CECT-494 T. Se pueden apreciar halos de inhibición tanto de *C. violaceum* como de la producción de pigmento (decoloración de la violaceína sobre el cultivo de *C. violaceum*).

Figura 15.

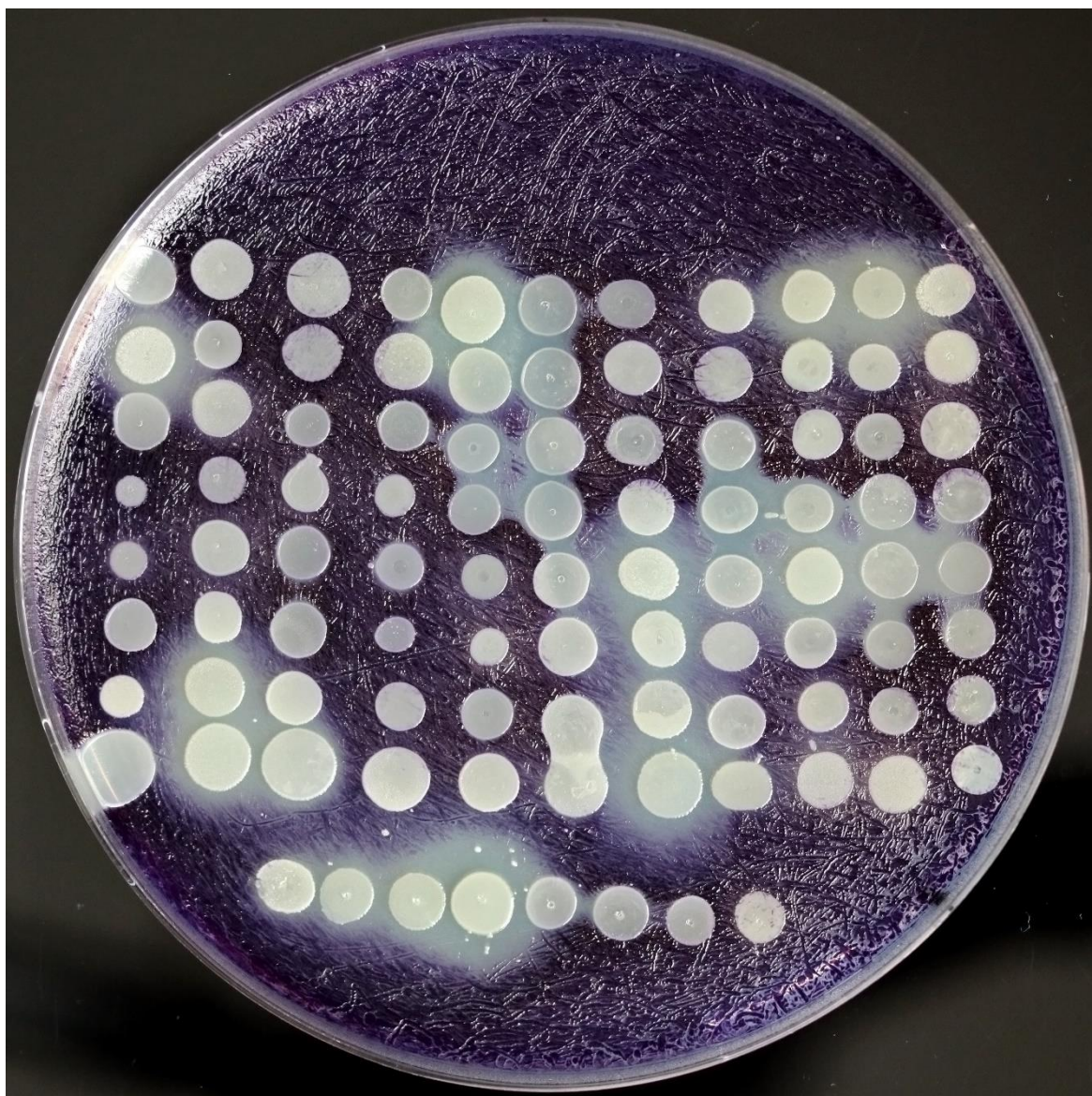


Figura 15. Actividad de distintas cepas aisladas de biofilms o de lodos frente a *C. violaceum* cepa CECT-494 T. Se pueden apreciar halos de inhibición tanto de *C. violaceum* como de la producción de pigmento (decoloración de la violaceína sobre el cultivo de *C. violaceum*).

Figura 16.

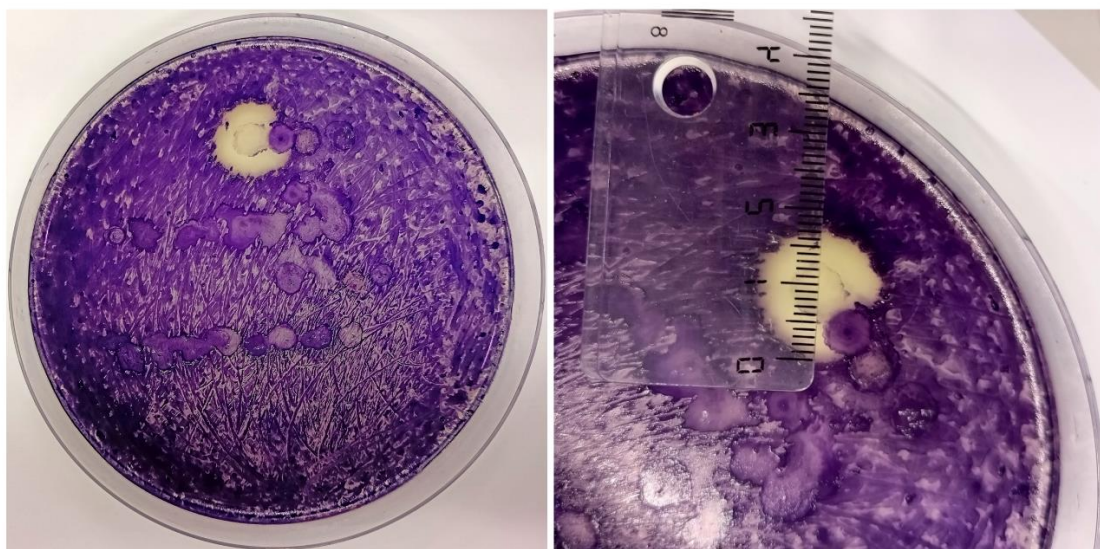


Figura 16. Actividad de distintas cepas aisladas de agua frente a *C. violaceum* cepa CECT-494 T. Se pueden apreciar halos de inhibición tanto de *C. violaceum* como de la producción de pigmento (decoloración de la violaceína sobre el cultivo de *C. violaceum*). A la derecha, comprobación del halo de inhibición de la cepa aislada de agua 213.

Formación de Biofilms

Se cuantificó mediante el método del cristal violeta la formación de biofilms por todas las cepas estudiadas en el presente trabajo. Las figuras 17-28 muestran los valores de DO_{600} obtenidos tras la solubilización del colorante internalizado por el biofilm o por las bacterias adheridas a la superficie de los pocillos, al cabo de 48 ± 2 horas de incubación a 26°C . El nivel de blanco -nivel de densidad óptica mínimo se estableció en 0,08 tras la medición de 20 pocillos control repartidos por las placas, y el nivel máximo de adherencia en algunas cepas alcanzó una DO_{600} de más de 5.5.

Figura 17.

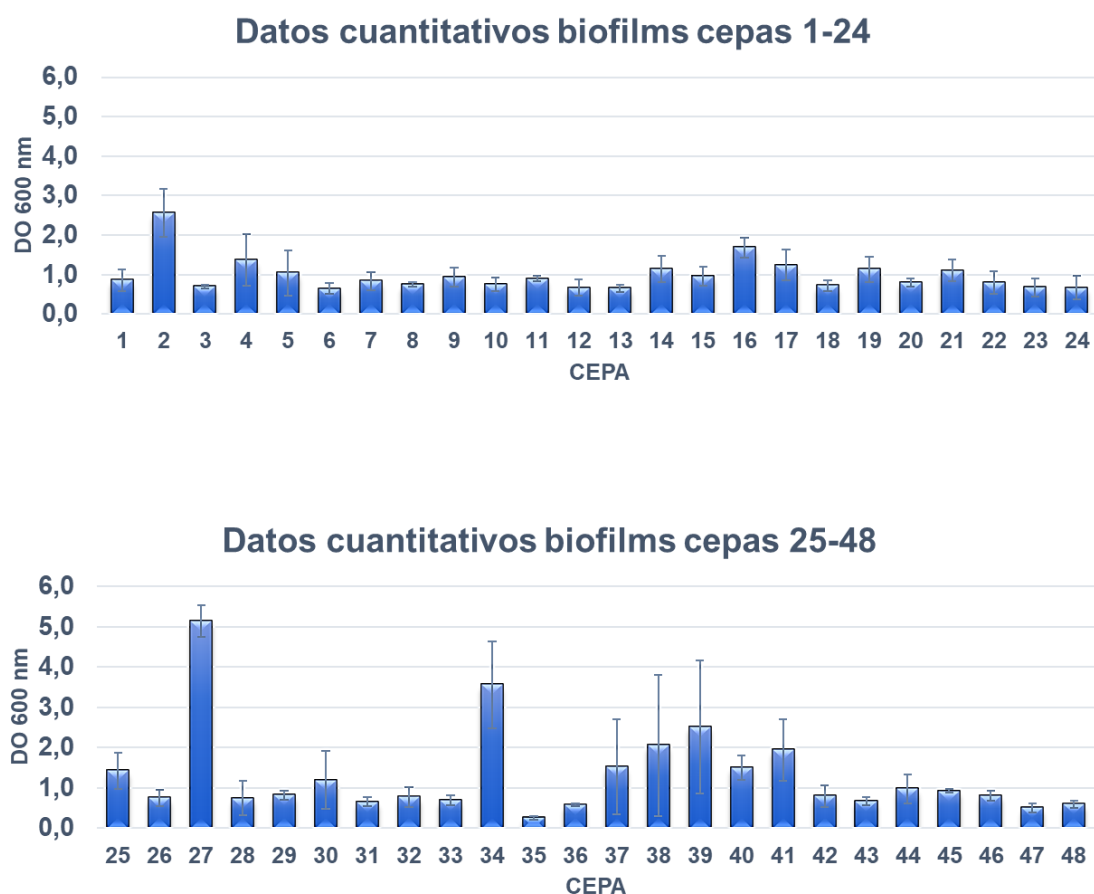


Figura 17. Densidad óptica del CV liberado por bacterias adherentes/biofilms en placas de 24 pocillos tras 48 de incubación a 26°C . Las barras de error indican la desviación estándar (SD).

Figura 18.

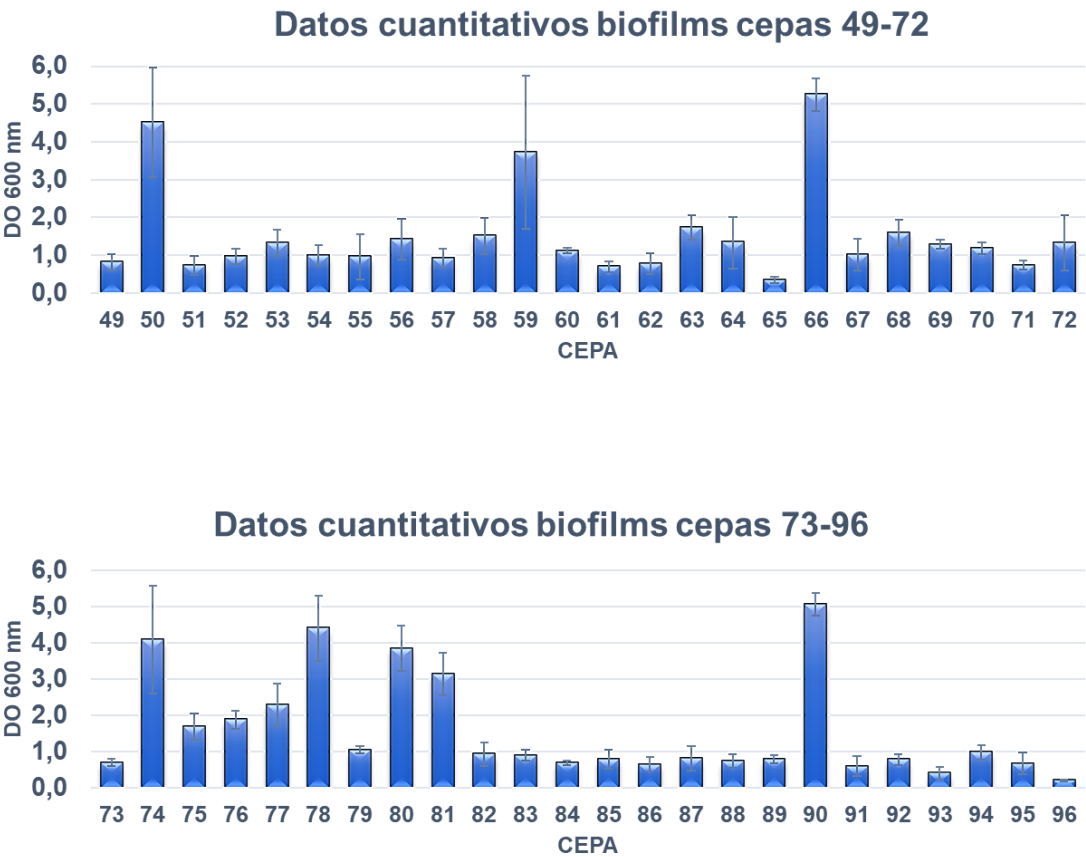


Figura 18. Densidad óptica del CV liberado por bacterias adherentes/biofilms en placas de 24 pocillos tras 48 de incubación a 26°C. Las barras de error indican la desviación estándar (SD).

Figura 19.

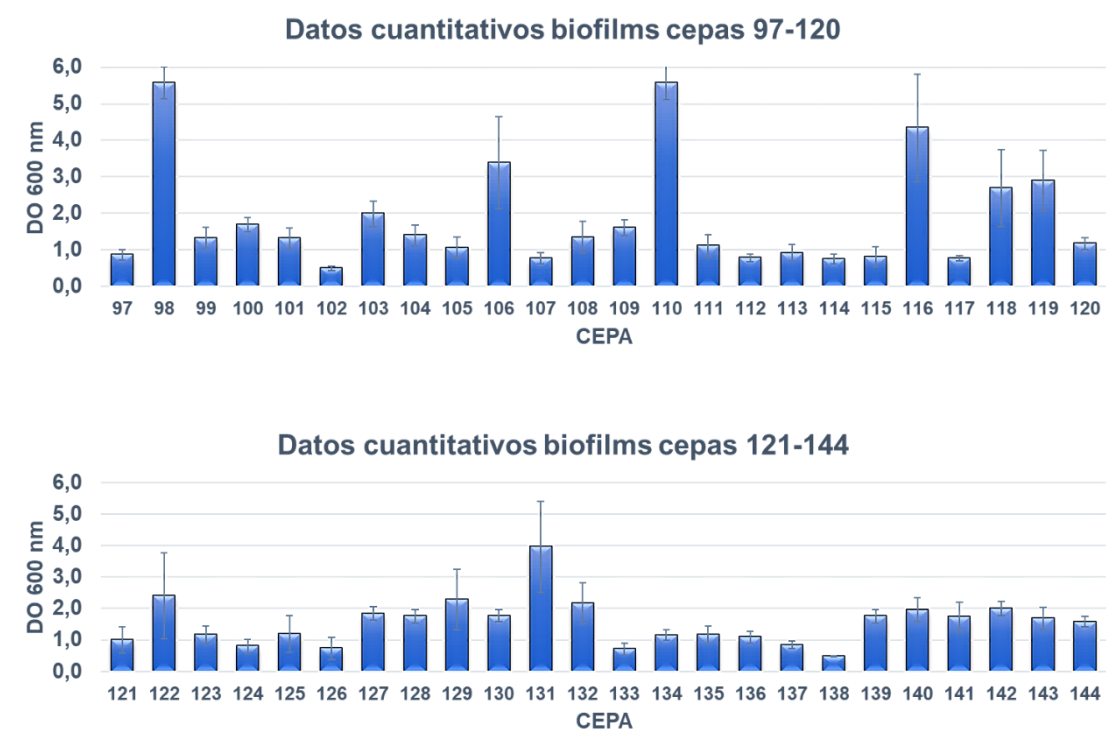


Figura 19. Densidad óptica del CV liberado por bacterias adherentes/biofilms en placas de 24 pocillos tras 48 de incubación a 26°C. Las barras de error indican la desviación estándar (SD).

Figura 20.

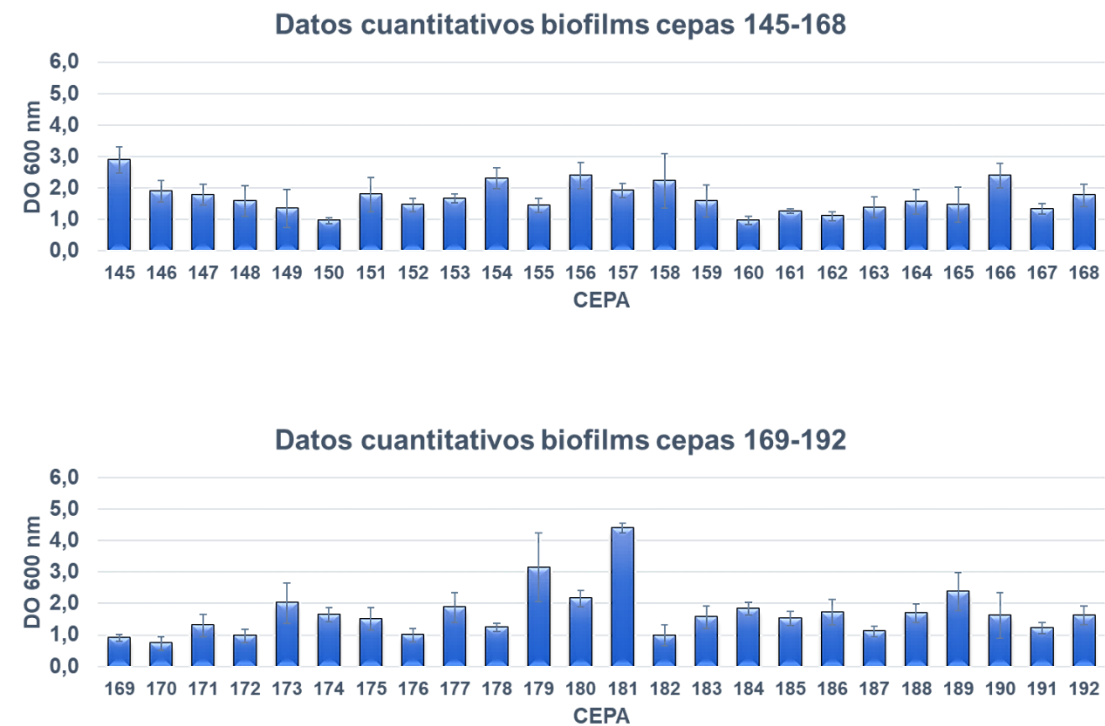


Figura 20. Densidad óptica del CV liberado por bacterias adherentes/biofilms en placas de 24 pocillos tras 48 de incubación a 26°C. Las barras de error indican la desviación estándar (SD).

Figura 21.

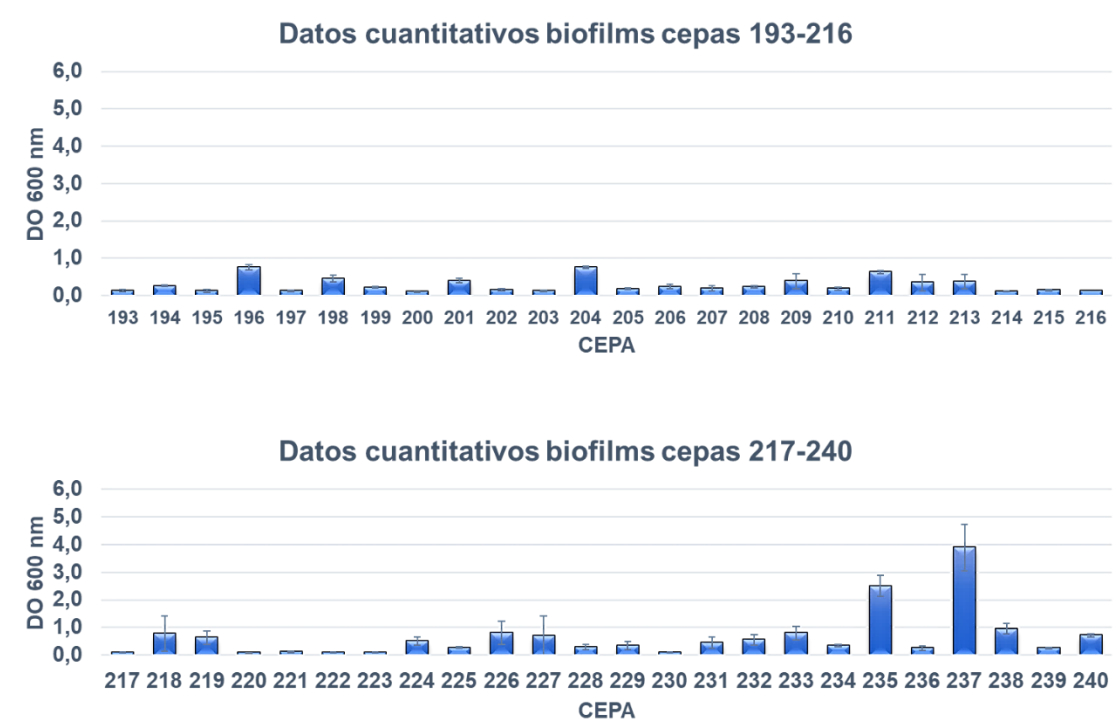


Figura 21. Densidad óptica del CV liberado por bacterias adherentes/biofilms en placas de 24 pocillos tras 48 de incubación a 26°C. Las barras de error indican la desviación estándar (SD).

Figura 22.

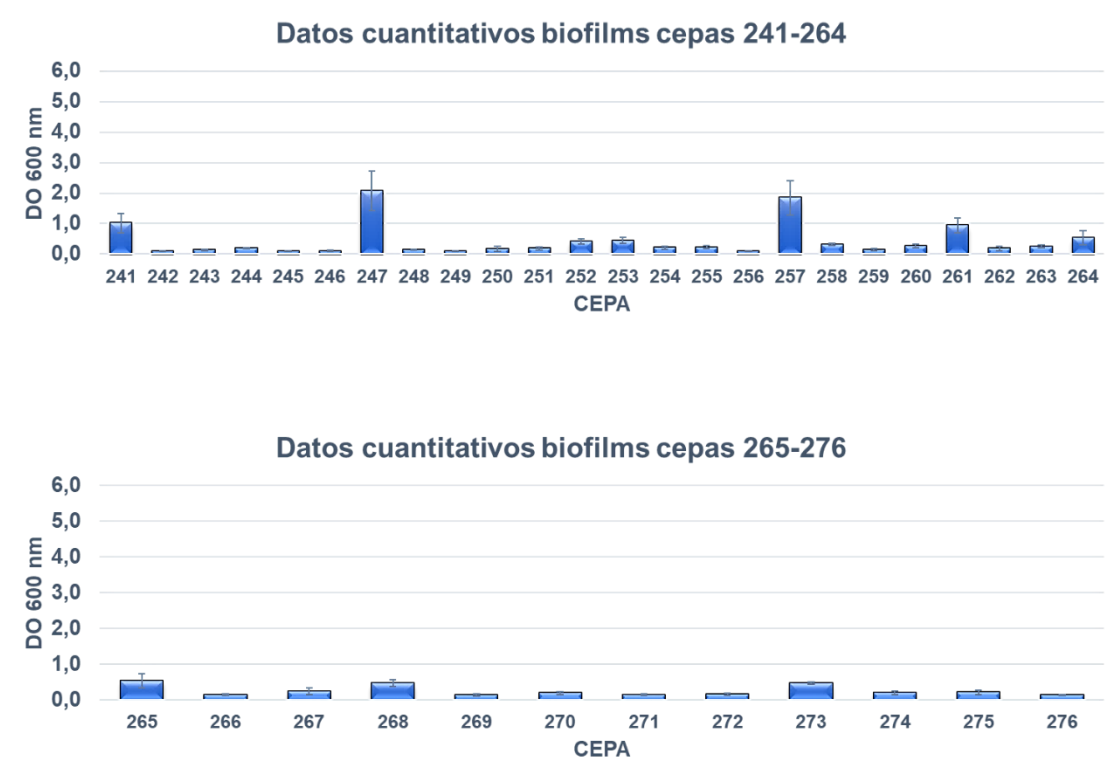


Figura 22. Densidad óptica del CV liberado por bacterias adherentes/biofilms en placas de 24 pocillos tras 48 de incubación a 26°C. Las barras de error indican la desviación estándar (SD).

Las figura 23 muestra algunos ejemplos de biofilms formados por las cepas durante su crecimiento en pocillos de placas de 24 pocillos. El número de cepa se indica debajo de cada pocillo.

Figura 23.

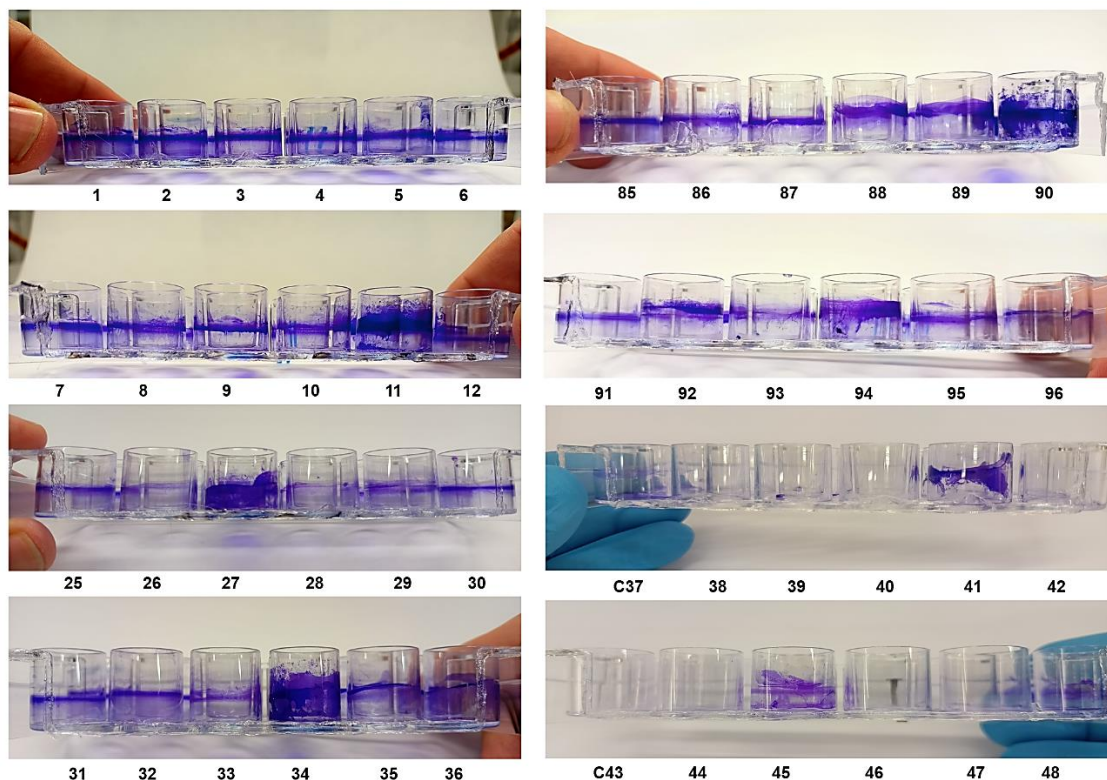


Figura 23. Biofilms formados en pocillos de placas de poliestireno por algunas de las cepas. El número de cada cepa esta debajo de su pocillo correspondiente.

Experimentos de inducción de fagos con Mitomicina C

Para establecer la concentración de Mitomicina C a utilizar en los ensayos de inducción, se seleccionaron algunas cepas al azar para realizar curvas de crecimiento y exposición a diferentes concentraciones de Mitomicina C. La concentración final de Mitomicina C que inducía un descenso marcado de la densidad óptica de los cultivos fue de $1\mu\text{g/mL}$, concentración que se utilizaría en los ensayos con las cepas ($n=180$). Se eligieron 2 lotes de cepas representativas de los ambientes en los que se tomaron las muestras inicialmente, por un lado, las que se aislaron inicialmente asociadas a biofilms y a superficies, y por otro lado, las que se aislaron de agua de los tanques, en contacto directo con los peces. Los resultados de las gráficas de crecimiento e inducción de fagos se muestran en las figuras 24-31B.

De un total de 180 cepas expuestas al inductor Mitomicina C, presentaron una desviación en la curva de crecimiento respecto a la tendencia de la fase exponencial, un total de 80, esto representa un 44% de las cepas utilizadas en los ensayos de Mitomicina C. Si lo separamos por grupos, en el bloque de cepas que se aisló a partir de superficies sólidas un total de 71 cepas presentaron una desviación de la curva, lo que representa un 59%. En cambio, las cepas aisladas principalmente de agua que se ensayaron con Mitomicina C ($n=60$), solo 9 presentaron una desviación de la tendencia de la curva de crecimiento, lo que representa tan solo un 15% de las cepas con posibles fagos.

Figura 24.

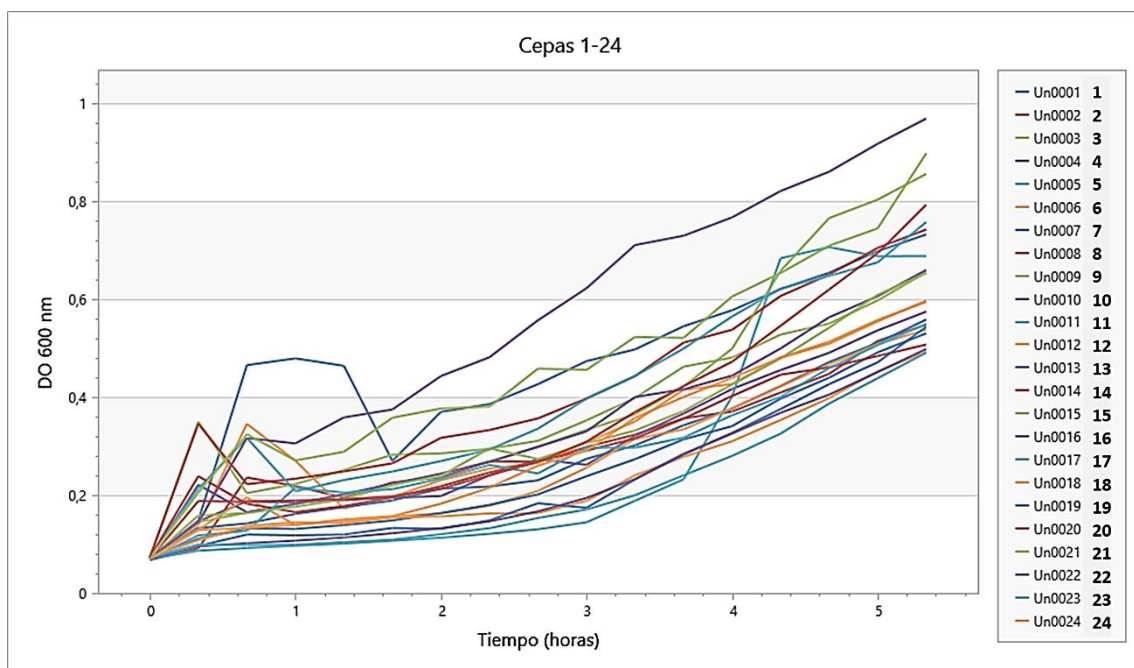


Figura 24. Curvas de crecimiento de las cepas 1-24 antes de la estimulación con Mitomicina C. Cada color de línea corresponde a una cepa distinta. El número de cepa se indica como pocillo en la placa de 24 pocillos.

Figura 24B.

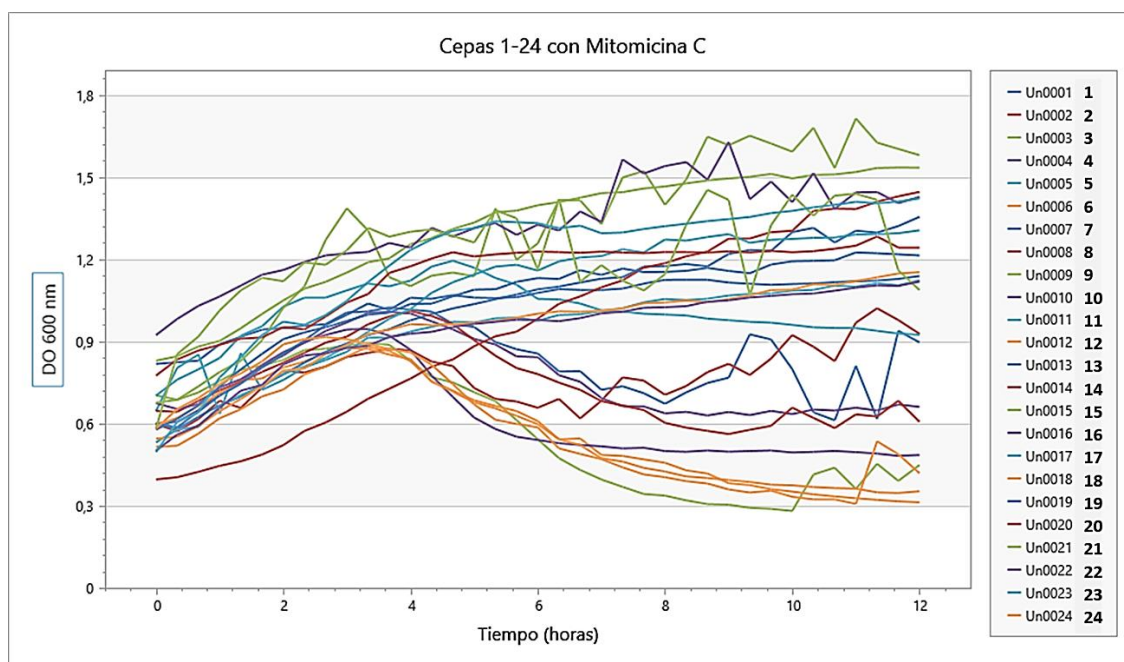


Figura 24B. Curvas de crecimiento de las cepas 1-24 tras la estimulación con Mitomicina C. Cada color de línea corresponde a una cepa distinta. El número de cepa se indica como pocillo en la placa de 24 pocillos. El declive en la curva de crecimiento es indicativo de la posible presencia de un fago.

Figura 25.

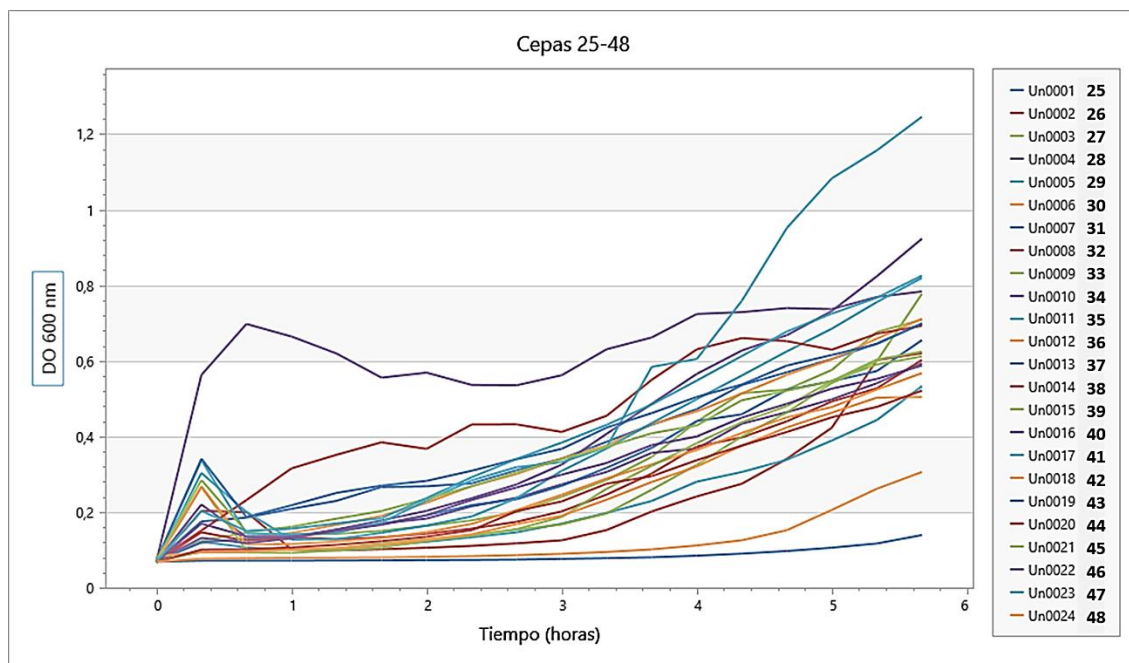


Figura 25. Curvas de crecimiento de las cepas 25-48 antes de la estimulación con Mitomicina C. Cada color de línea corresponde a una cepa distinta. El número de cepa se indica como pocillo en la placa de 24 pocillos.

Figura 25B.

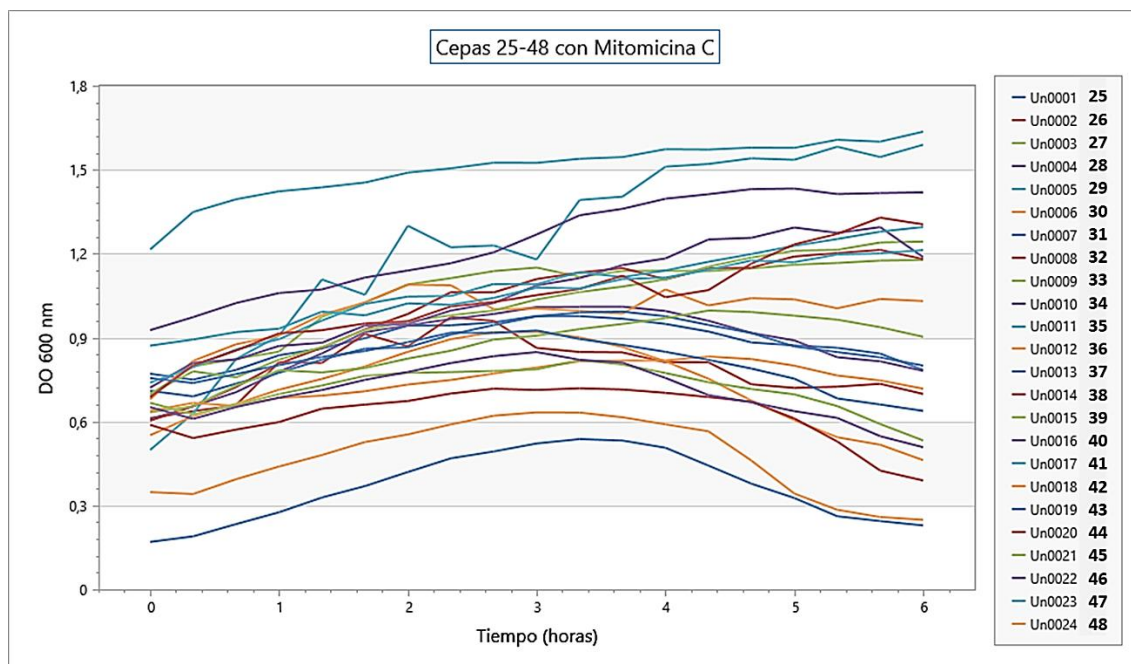


Figura 25B. Curvas de crecimiento de las cepas 25-48 tras la estimulación con Mitomicina C. Cada color de línea corresponde a una cepa distinta. El número de cepa se indica como pocillo en la placa de 24 pocillos. El declive en la curva de crecimiento es indicativo de la posible presencia de un fago.

Figura 26.

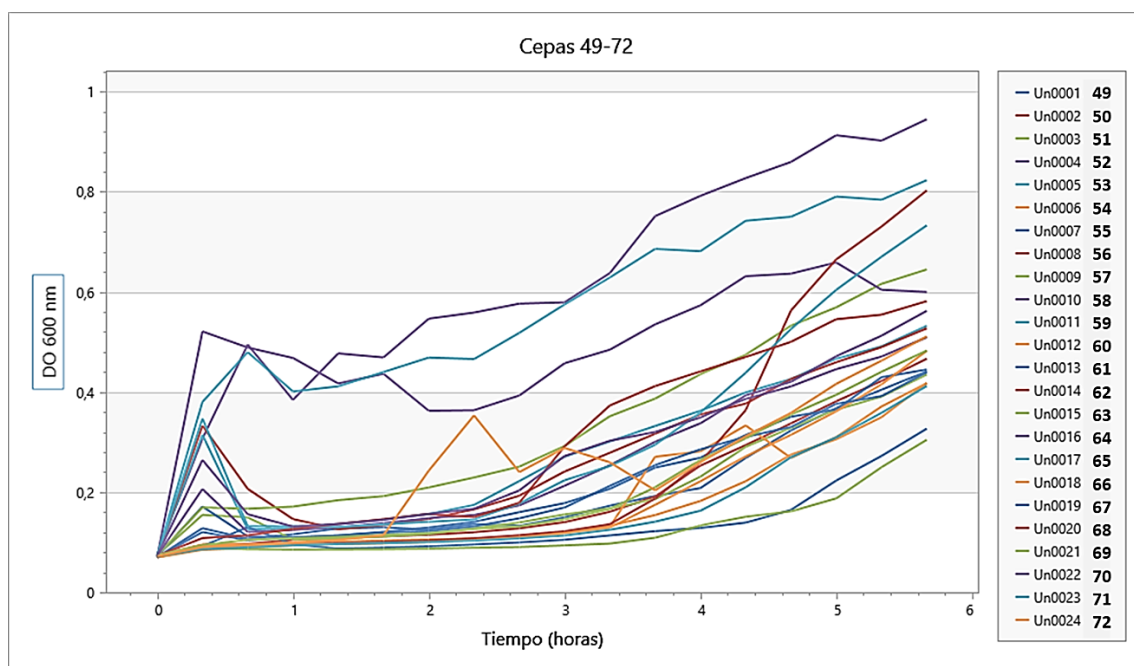


Figura 26. Curvas de crecimiento de las cepas 49-72 antes de la estimulación con Mitomicina C. Cada color de línea corresponde a una cepa distinta. El número de cepa se indica como pocillo en la placa de 24 pocillos.

Figura 26B.

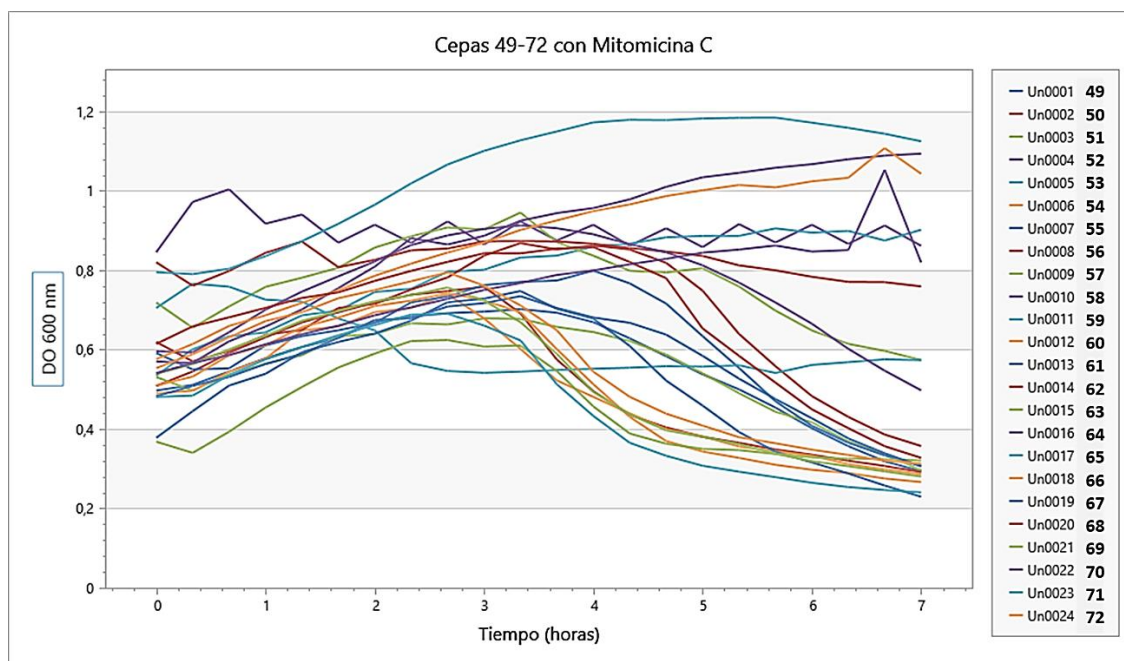


Figura 26B. Curvas de crecimiento de las cepas 49-72 tras la estimulación con Mitomicina C. Cada color de línea corresponde a una cepa distinta. El número de cepa se indica como pocillo en la placa de 24 pocillos. El declive en la curva de crecimiento es indicativo de la posible presencia de un fago.

Figura 27.

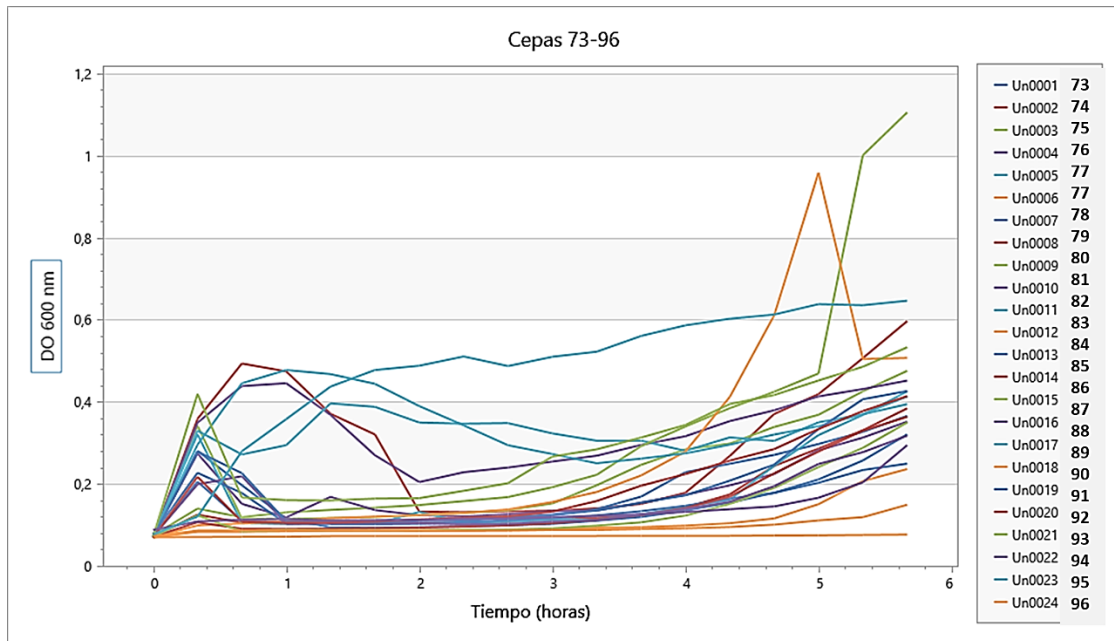


Figura 27. Curvas de crecimiento de las cepas 73-96 antes de la estimulación con Mitomicina C. Cada color de línea corresponde a una cepa distinta. El número de cepa se indica como pocillo en la placa de 24 pocillos.

Figura 27B.

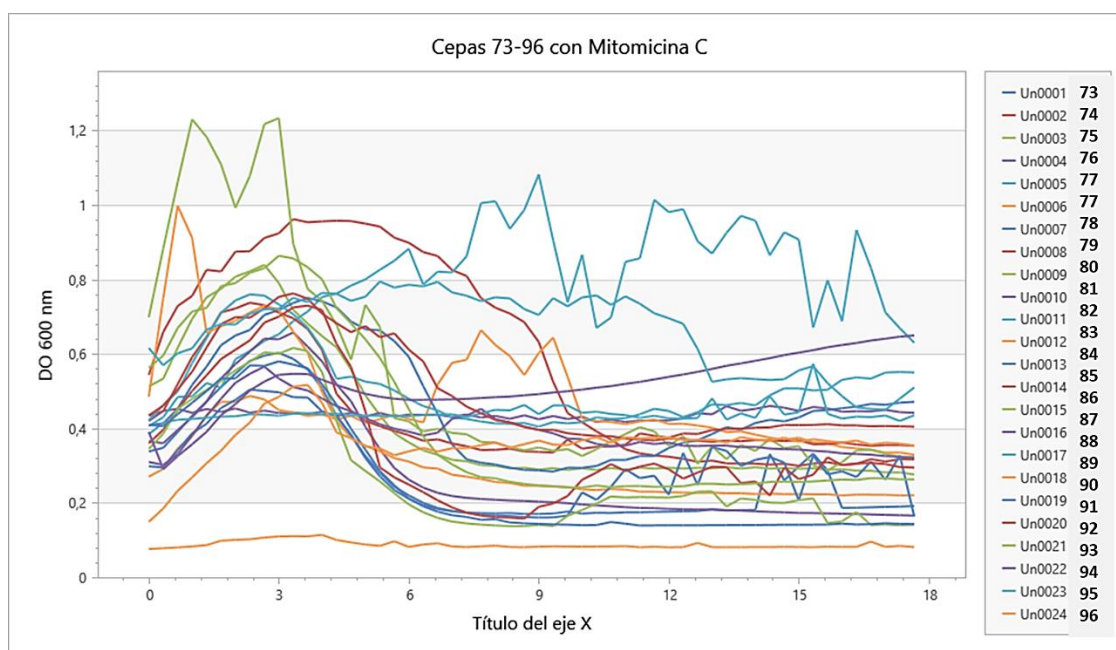


Figura 27B. Curvas de crecimiento de las cepas 73-96 tras la estimulación con Mitomicina C. Cada color de línea corresponde a una cepa distinta. El número de cepa se indica como pocillo en la placa de 24 pocillos. El declive en la curva de crecimiento es indicativo de la posible presencia de un fago.

Figura 28.

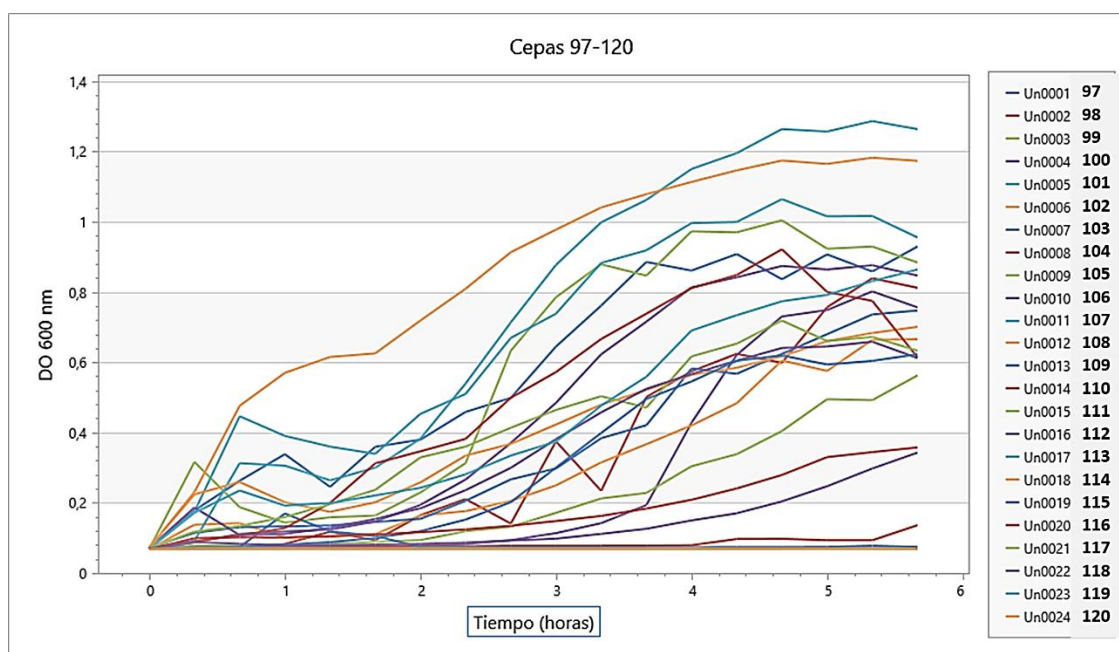


Figura 28. Curvas de crecimiento de las cepas 97-120 antes de la estimulación con Mitomicina C. Cada color de línea corresponde a una cepa distinta. El número de cepa se indica como pocillo en la placa de 24 pocillos.

Figura 28B.

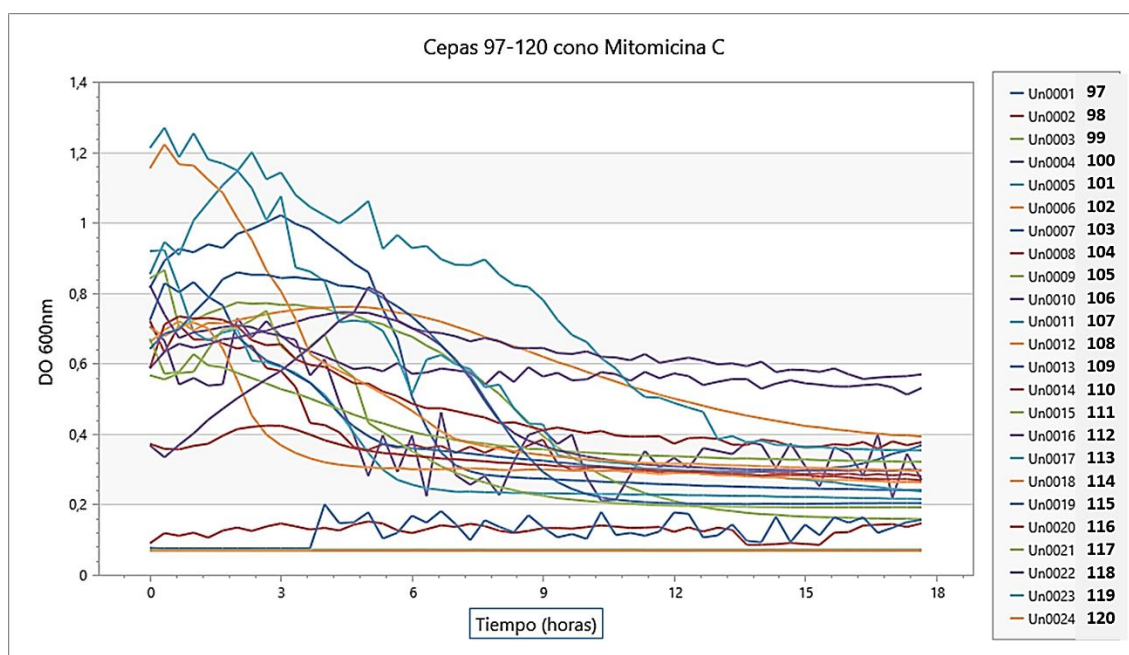


Figura 28B. Curvas de crecimiento de las cepas 97-120 tras la estimulación con Mitomicina C. Cada color de línea corresponde a una cepa distinta. El número de cepa se indica como pocillo en la placa de 24 pocillos. El declive en la curva de crecimiento es indicativo de la posible presencia de un fago.

Figura 29.

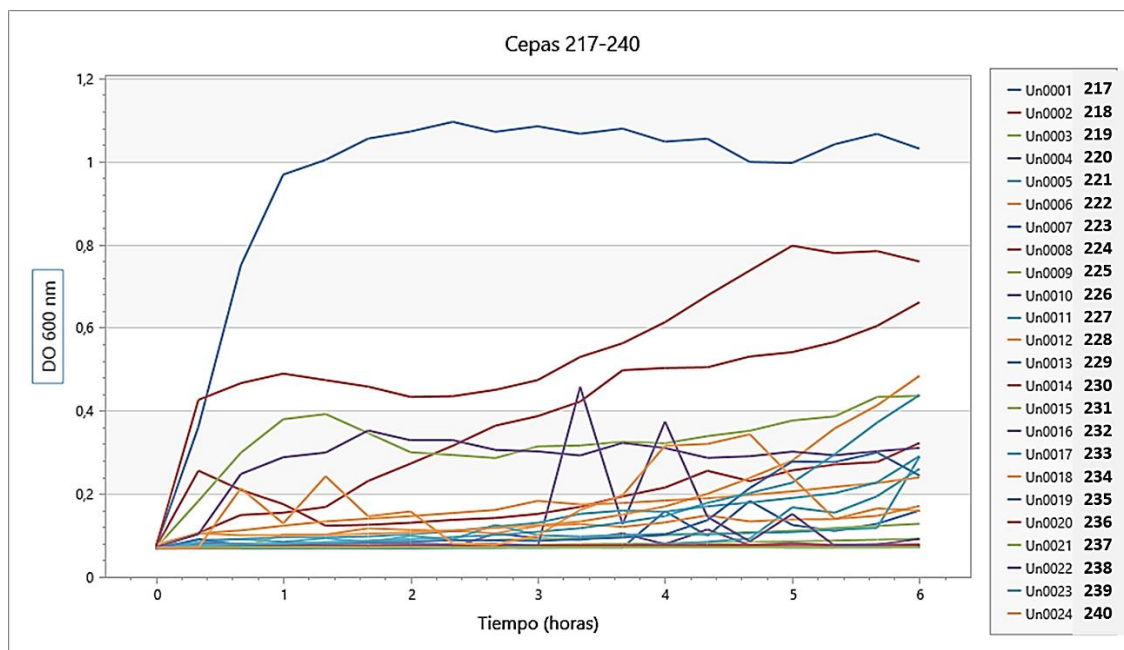


Figura 29. Curvas de crecimiento de las cepas 217-240 antes de la estimulación con Mitomicina C. Cada color de línea corresponde a una cepa distinta. El número de cepa se indica como pocillo en la placa de 24 pocillos.

Figura 29B.

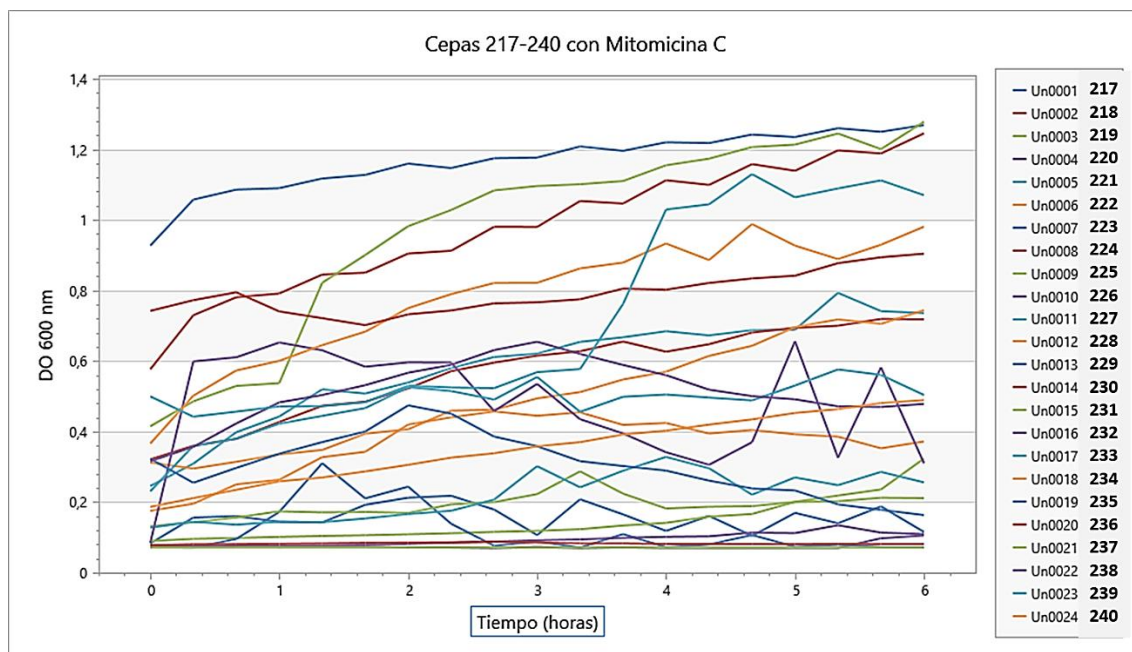


Figura 29B. Curvas de crecimiento de las cepas 217-240 antes de la estimulación con Mitomicina C. Cada color de línea corresponde a una cepa distinta. El número de cepa se indica como pocillo en la placa de 24 pocillos.

Figura 30.

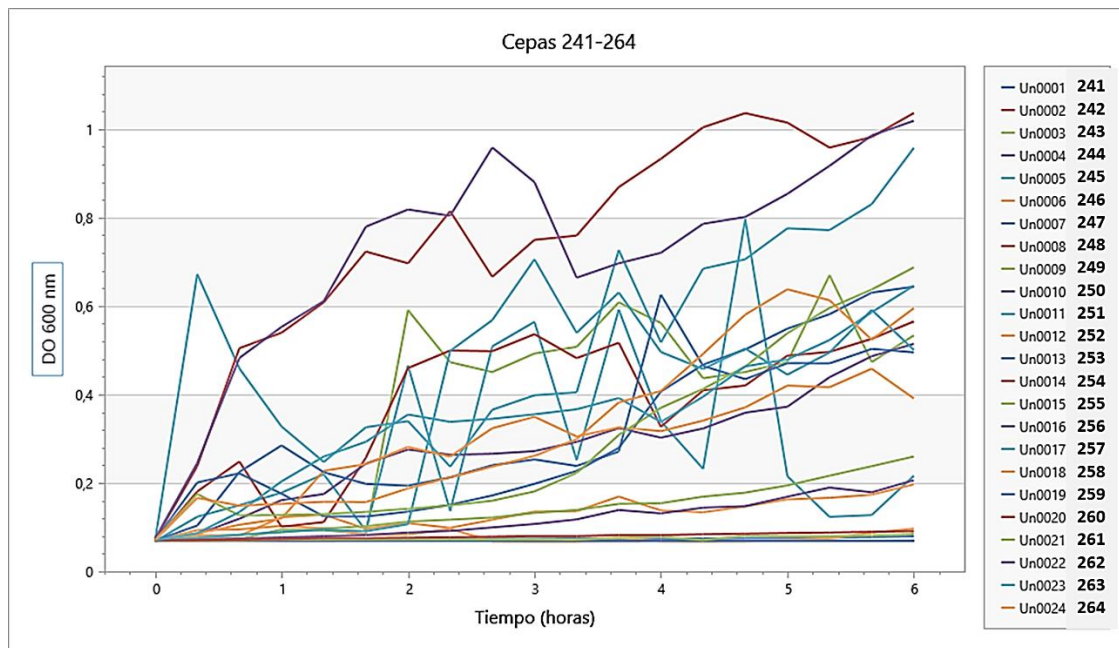


Figura 30. Curvas de crecimiento de las cepas 241-264 antes de la estimulación con Mitomicina C. Cada color de línea corresponde a una cepa distinta. El número de cepa se indica como pocillo en la placa de 24 pocillos.

Figura 30B.

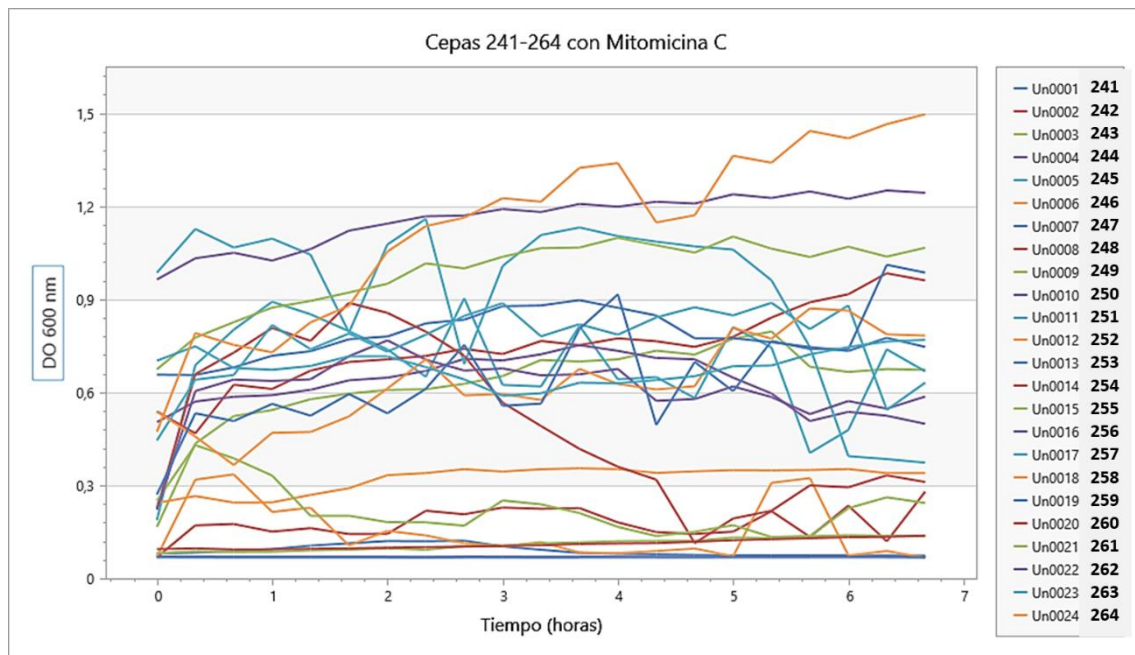


Figura 30B. Curvas de crecimiento de las cepas 241-264 antes de la estimulación con Mitomicina C. Cada color de línea corresponde a una cepa distinta. El número de cepa se indica como pocillo en la placa de 24 pocillos.

Figura 31.

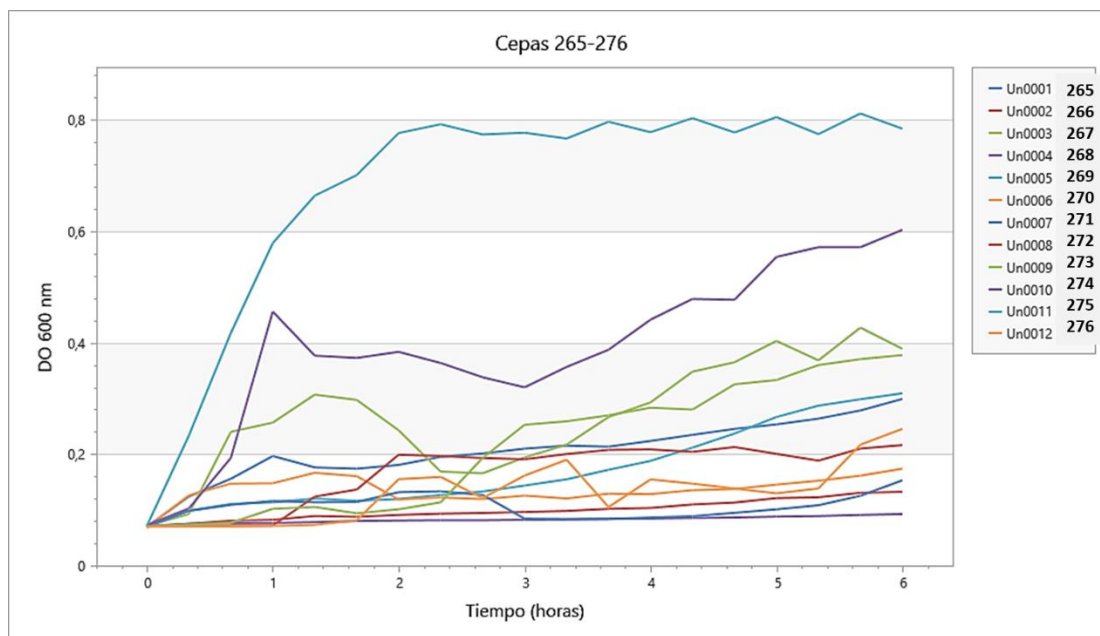


Figura 31. Curvas de crecimiento de las cepas 265-276 antes de la estimulación con Mitomicina C. Cada color de línea corresponde a una cepa distinta. El número de cepa se indica como pocillo en la placa de 24 pocillos.

Figura 31B.

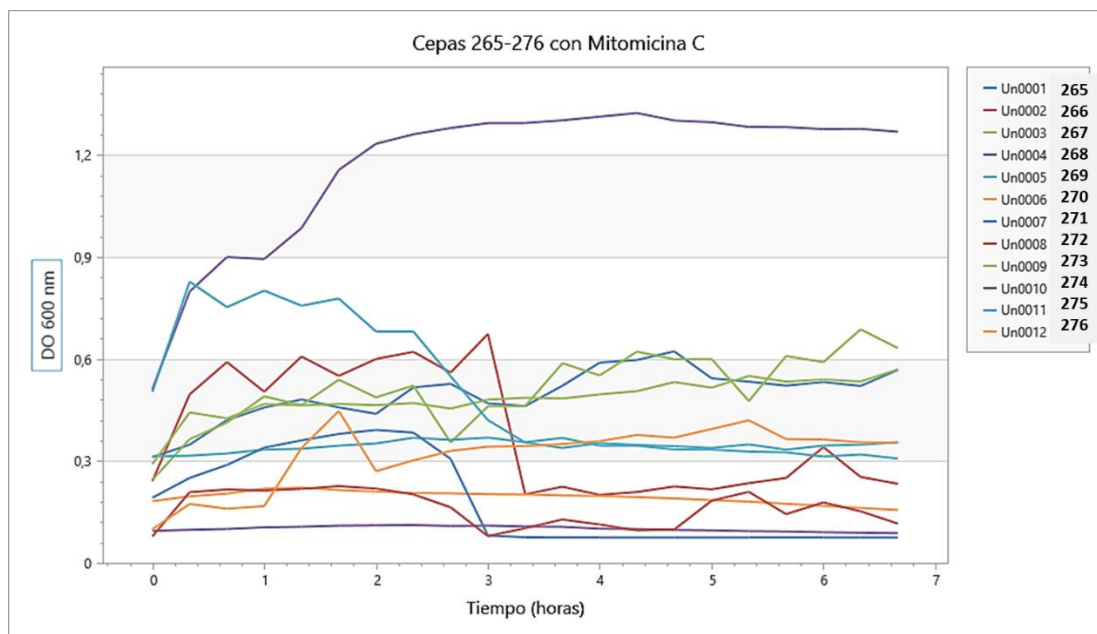


Figura 31B. Curvas de crecimiento de las cepas 265-276 antes de la estimulación con Mitomicina C. Cada color de línea corresponde a una cepa distinta. El número de cepa se indica como pocillo en la placa de 24 pocillos.

Secuenciación de genomas completos

El resultado de la secuenciación de 8 de las cepas que presentaban actividad antimicrobiana contra alguno de los patógenos de peces ensayados demostró que la mayoría de bacterias con actividad antagonista pertenecían a bacterias Gram positivas de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* y *Rhododoccus*. Los datos se muestran en la tabla 3. El porcentaje de identidad cuando se compararon su genomas con la base de datos mostró que en todos los casos menos uno, este porcentaje fue superior al 74%. En el caso de la identificación de especie como *Rhodococcus aetherivorans* el porcentaje fue tan solo del 34.87 %. El tamaño de los genomas, el contenido en GC, el número de reads, el número de contigs y la profundidad de la secuenciación se muestran en la tabla 3.

El análisis del ensamblaje de las secuencias se realizó estudiando los siguientes parámetros:

Muestra: nombre de la muestra

Reads: Número total de lecturas después del filtrado de calidad.

AvgReadLen: Longitud media de lectura después del filtrado de calidad

Contigs: Número de contigs del draft del genoma (>200pb)

GLength: Longitud (pb) del draft del genoma

AvgContigLen: Longitud media de los contigs (>200bp)

N50: Longitud del contig más pequeño del conjunto que contiene el menor número (más grande) de contigs cuya longitud combinada represente al menos el 50% del conjunto

GC: Contenido en GC (%) del draft del genoma

Depth: Número de veces que cada posición de nucleótido en el borrador del genoma tiene una lectura que se alinea con esa posición.

Especie: Especie identificada por el programa Kraken

PercentID: Número de lecturas “reads” como (%) asignado como esa especie por Kraken

Tabla 3. Resultados generales de la secuenciación de las cepas seleccionadas.

Cepa	Reads	AvgReadLen	Contigs	GLength	AvgContig	GC	Depth	Especie	%ID
237	866096	265	210	5819503	706223	45,5	39X	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	76,6
241	1733130	272	145	5134953	417237	41,4	91X	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	98,6
253	1753928	275	208	5674761	689621	37,7	84X	<i>Bacillus megaterium</i>	79,4
238	370206	268	468	6321024	176956	70	15X	<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	34,9
230	870064	274	54	4263012	861385	43	55X	<i>Bacillus atrophaeus</i>	74
107	824610	271	54	4097633	1180898	43,9	54X	<i>Bacillus subtilis</i>	95,7
32	990884	269	138	4111344	350463	43,9	64X	<i>Bacillus subtilis</i>	95
91	1091086	268	206	4372367	285240	43,7	66X	<i>Bacillus subtilis</i>	77

Las cepas secuenciadas se analizaron mediante el servidor RAST: [RAST Server - RAST Annotation Server \(nmpdr.org\)](http://RAST.Server)

Las figuras 32 a 29 muestran la distribución de los distintos subsistemas en las cepas secuenciadas.

A continuación se muestran los resultados del análisis RAST de las 8 cepas secuenciadas.

Cepa 237

RAST

Factores de virulencia: No se encontraron factores de virulencia clásicos importantes.

Genes de resistencia: Se encontraron secuencias parciales con similitud a proteínas implicadas en la resistencia a Vancomicina, Tetraciclina y Fluoroquinolonas, y 3 Beta-lactamasas.

Fagos: No se encontraron genomas completos de bacteriófagos.

Plásmidos: No se encontraron plásmidos.

Figura 32.

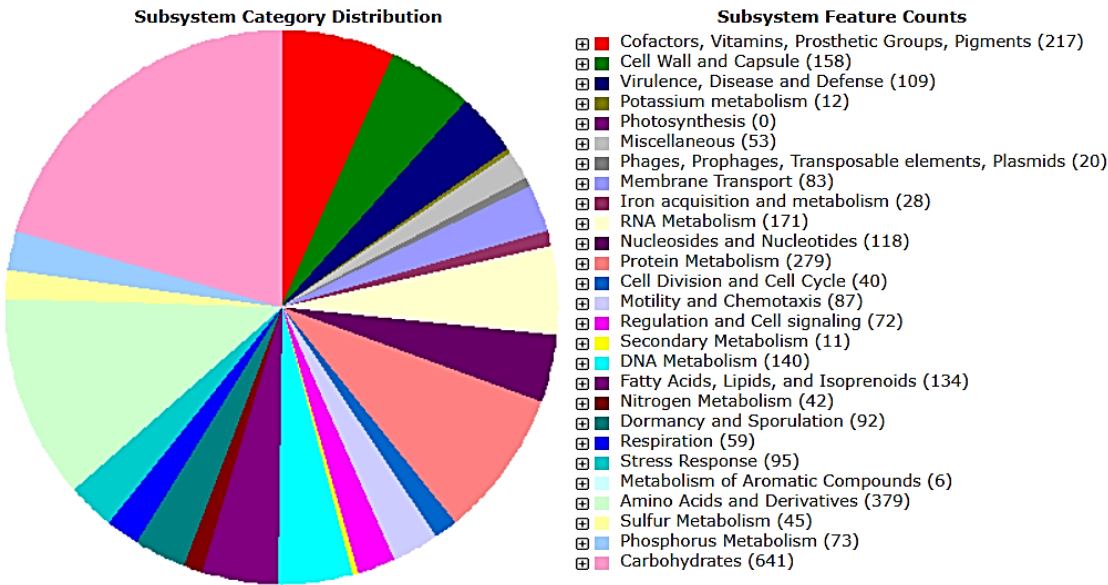


Figura 32. Subsistemas dentro del genoma de la cepa 237

Cepa 241

RAST

Factores de virulencia: Se encontraron secuencias parciales para la síntesis de sideróforos. No se encontraron otros factores de virulencia clásicos importantes.

Genes de resistencia: No se encontraron genes de resistencia a antibióticos importantes.

Fagos: No se encontraron genomas completos de bacteriófagos.

Plásmidos: No se encontraron plásmidos.

Figura 33.

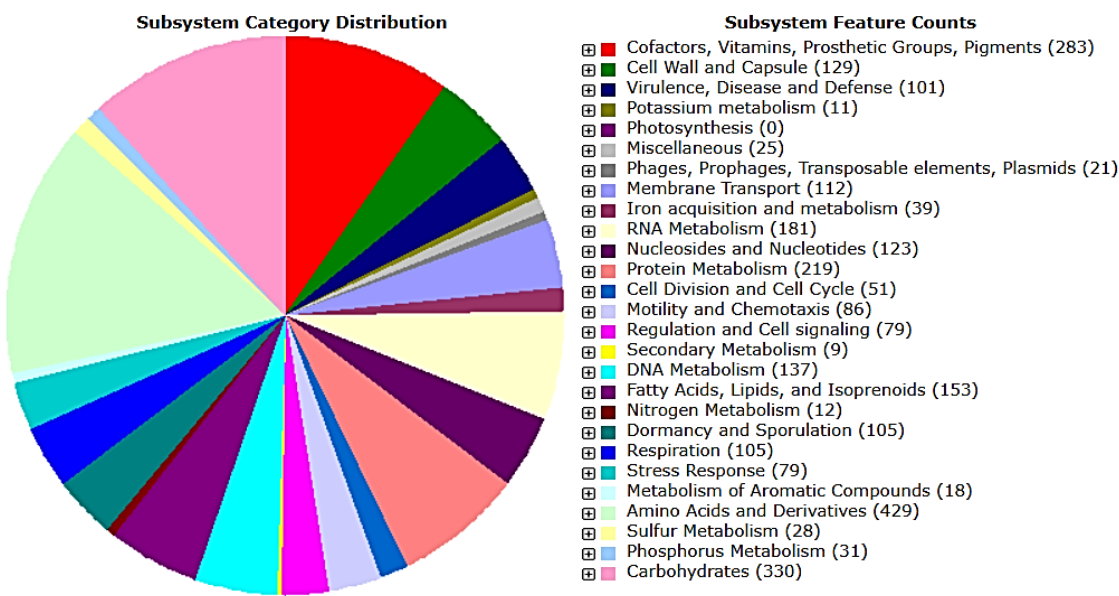


Figura 33. Subsistemas dentro del genoma de la cepa 241

Cepa 253

RAST

Factores de virulencia: Se encontraron secuencias parciales para la síntesis de sideróforos. No se encontraron otros factores de virulencia clásicos importantes.

Genes de resistencia: Se encontraron enzimas relacionadas con la resistencia a Fluoroquinolonas y varias B-lactamasas. También se encontraron 3 genes relacionados con la resistencia a Tetraciclina, Vancomicina y a Fosfomicina, respectivamente.

Fagos: No se encontraron genomas completos de bacteriófagos.

Plásmidos: No se encontraron plásmidos.

Figura 34.

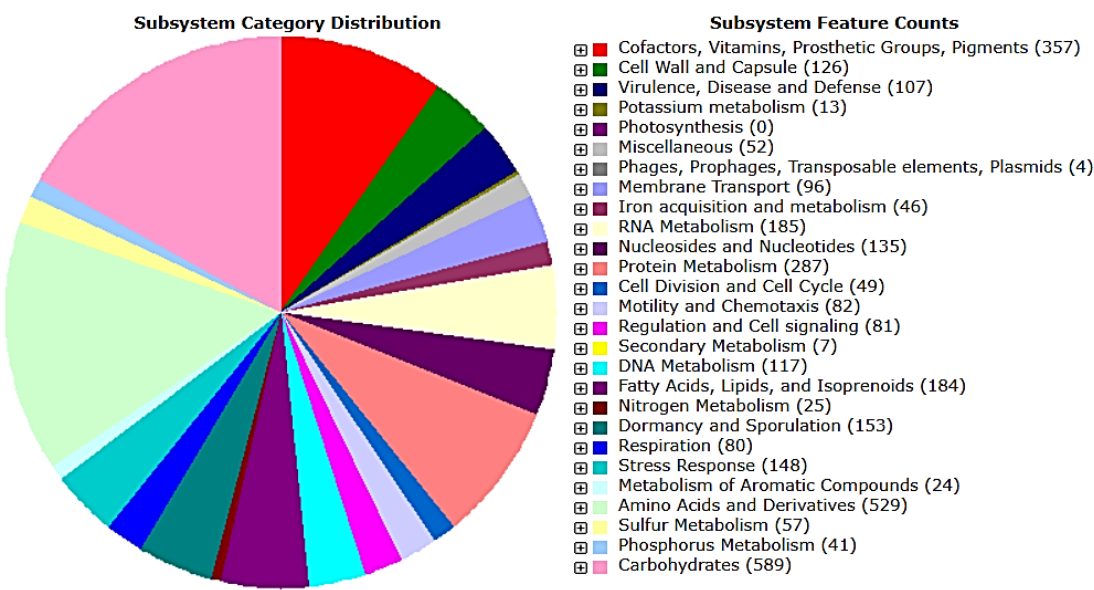


Figura 34. Subsistemas dentro del genoma de la cepa 253

Cepa 238

RAST

Factores de virulencia: Se encontraron secuencias parciales para la síntesis de sideróforos. No se encontraron otros factores de virulencia clásicos importantes.

Genes de resistencia: Se encontraron enzimas relacionadas con la resistencia a Vancomicina, Fluoroquinolonas y varias B-lactamasas.

Fagos: No se encontraron genomas completos de bacteriófagos.

Plásmidos: No se encontraron plásmidos.

Figura 35.

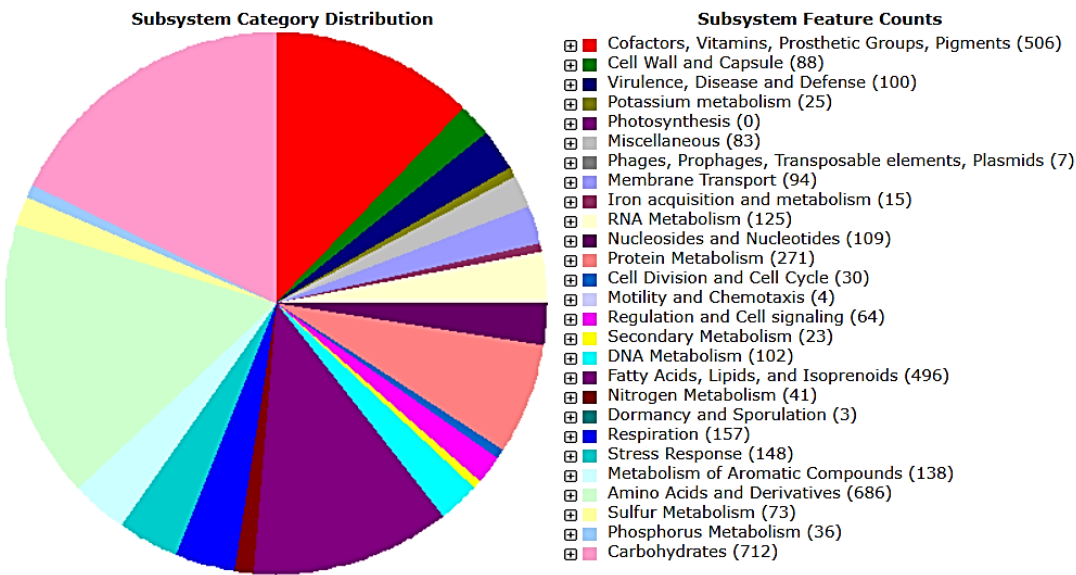


Figura 35. Subsistemas dentro del genoma de la cepa 238

Cepa 230

RAST

Factores de virulencia: No se encontraron otros factores de virulencia clásicos importantes.

Genes de resistencia: Se encontraron enzimas que confieren resistencia a fluoroquinolonas, y varias B-lactamasas.

Fagos: Se encontró un fago completo.

Plásmidos: No se encontraron plásmidos.

Figura 36.

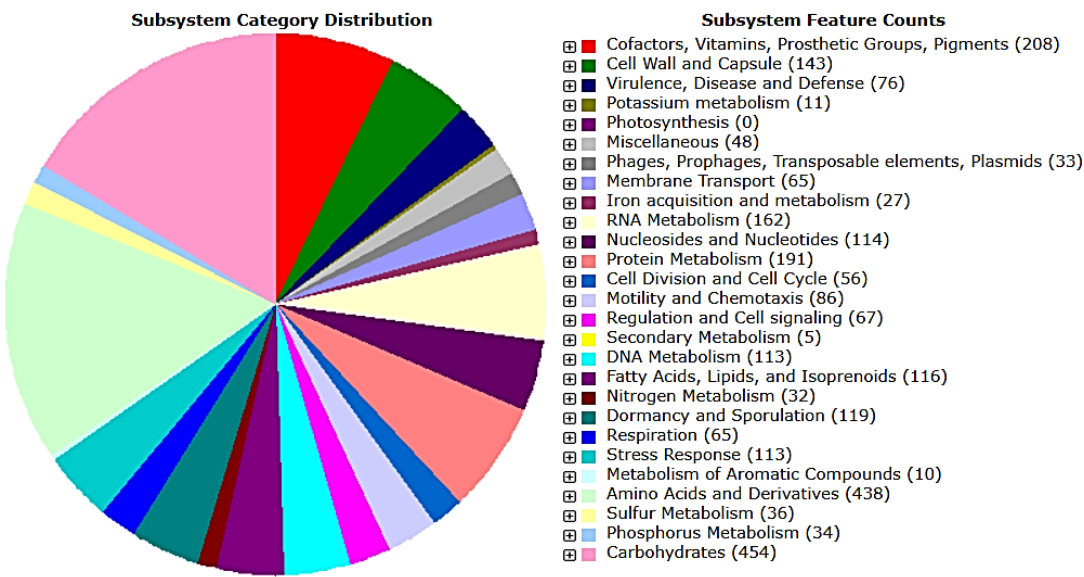


Figura 36. Subsistemas dentro del genoma de la cepa 230

Cepa 107

RAST

Factores de virulencia: No se encontraron otros factores de virulencia clásicos importantes.

Genes de resistencia: Se encontraron enzimas que confieren resistencia a Vancomicina, Fluoroquinolonas, Fosfomicina, y algunas B-Lactamasas.

Fagos: Se encontró un fago incompleto.

Plásmidos: No se encontraron plásmidos.

Figura 37.

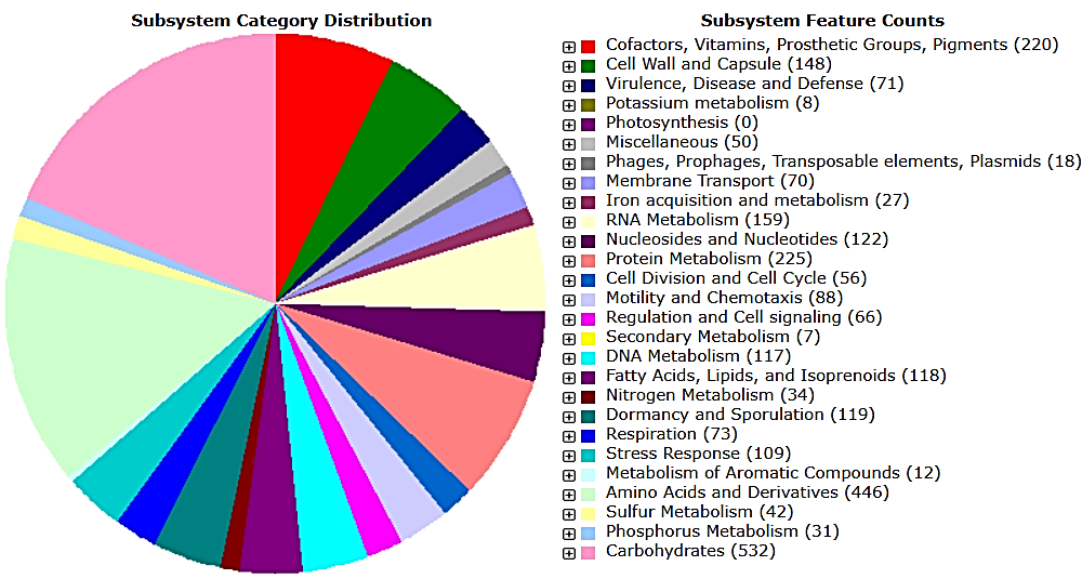


Figura 37. Subsistemas dentro del genoma de la cepa 107

Cepa 32

RAST

Factores de virulencia: No se encontraron otros factores de virulencia clásicos importantes.

Genes de resistencia: Se encontraron enzimas que confieren resistencia a Vancomicina, Fosmomicina, Fluoroquinolonas y algunas B-lactamasas.

Fagos: Se encontró un fago incompleto.

Plásmidos: No se encontraron plásmidos.

Figura 38.

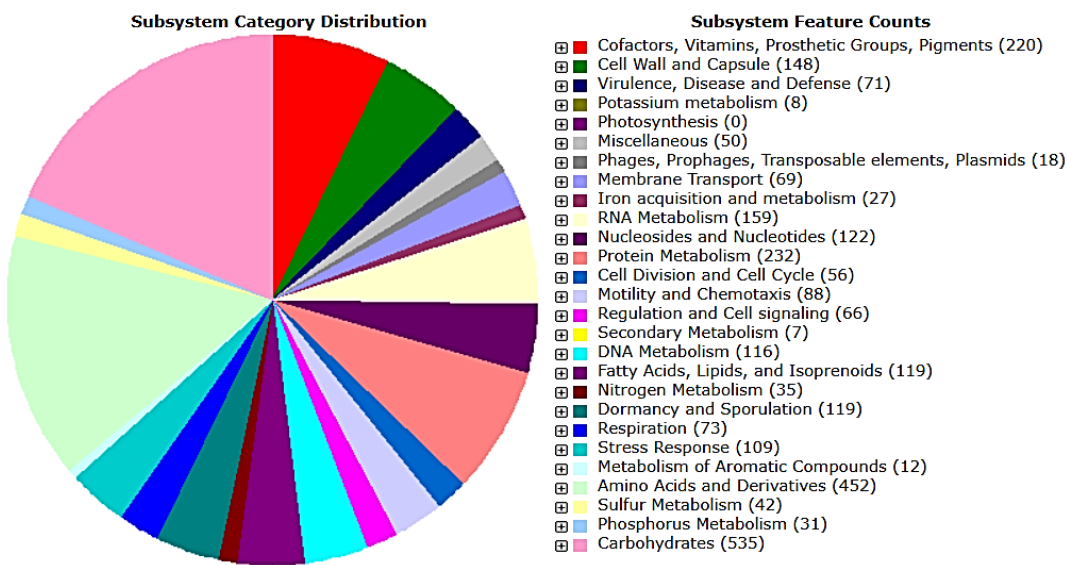


Figura 38. Subsistemas dentro del genoma de la cepa 32

Cepa 91

RAST

Factores de virulencia: No se encontraron otros factores de virulencia clásicos importantes.

Genes de resistencia: Se encontraron enzimas que confieren resistencia a Vancomicina, Fosmomicina, Fluoroquinolonas y algunas B-lactamasas.

Fagos: Se detectó un fago completo.

Plásmidos: No se detectaron plásmidos.

Figura 39.

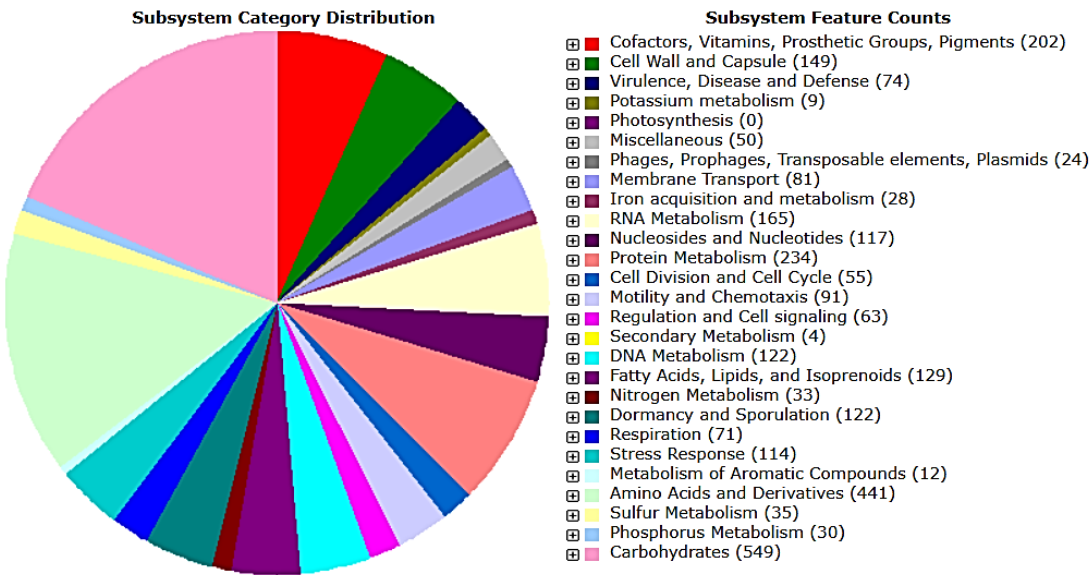


Figura 39. Subsistemas dentro del genoma de la cepa 91

Presencia de genes de Resistencia.

Se analizaron los genomas de las cepas secuenciadas para buscar genes de resistencia conocidos. Y se anotó la presencia o ausencia de genes de resistencia en cada una de ellas, que presentaban un porcentaje de identidad y una cobertura de > 90% respecto a secuencias de las bases de datos. Se analizaron por TORMES los genes completos y se encontró que la cepa identificada como *Brevibacillus laterosporus* presentó en su genoma VanHAX_PA_1, relacionado con los genes *vanH*, *vanA* y *vanX* de resistencia a antibióticos glicopéptidicos, debido a que sintetizan precursores del peptidoglicano con baja afinidad por este tipo de antibióticos (Gholizadeh and Courvalin, 2000).

Presencia de secuencias de profagos en los genomas secuenciados.

De los 8 genomas secuenciados, 3 de ellos presentaron 1 o más bacteriófagos en su genoma. Algunos fueron detectados directamente con RAST. Se realizó en paralelo un análisis más preciso con PHASTER. A continuación se muestran los resultados del análisis de los genomas con PHASTER de cada una de las cepas donde se encontraron fagos.

El programa identifica las secuencias de regiones de profagos y las asigna un color según se encuentren intactas (verde), incompletas (rojo) o cuestionables (azul).

En la figura 40 se muestran los profagos encontrados en la cepa 241. En la Figura 40B se muestra la organización genómica de la región intacta del profago.

Figura 40.

gi|00000000|ref|NC_000000| Genome: Raw sequence 5129363, gc%: 41.37%

Download summary as .txt file: [summary.txt](#)

Total: 5 prophage regions have been identified, of which 1 regions are intact, 3 regions are incomplete, and 1 regions are questionable.

Region	Region Length	Completeness	Score	# Total Proteins	Region Position	Most Common Phage	GC %	Details
NODE_10_length_122283_cov_62.786290								
1	28Kb	incomplete	40	27	2932-31025	PHAGE_Staphy_Phi12_NC_004616(2)	42.59%	Show
NODE_20_length_88847_cov_56.687737								
2	64Kb	intact	140	88	35-64079	PHAGE_Paenib_Tripp_NC_028930(27)	47.10%	Show
NODE_46_length_34108_cov_34.627380								
3	27Kb	incomplete	40	27	6736-33742	PHAGE_Brevib_Jenst_NC_028805(24)	39.35%	Show
NODE_50_length_32876_cov_58.373080								
4	32.2Kb	questionable	90	60	211-32456	PHAGE_Brevib_Jimmer2_NC_041976(31)	38.74%	Show
NODE_61_length_18595_cov_51.138726								
5	16.8Kb	incomplete	50	27	991-17829	PHAGE_Brevib_Abouo_NC_029029(16)	37.91%	Show

Figura 40. Presencia de profagos en la cepa 241.

Figura 40B.

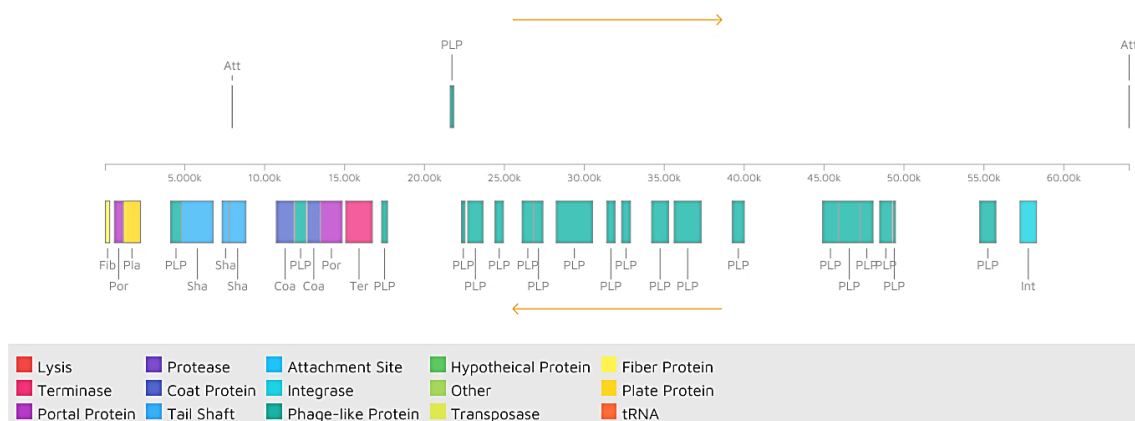


Figura 40B. Organización genómica de la región intacta del profago de la cepa 241, realizada por PHASTER.

En la figura 41 se muestran los profagos encontrados en la cepa 91.

Figura 41.

gi|000000000|ref|NC_000000| Genome; Raw sequence 4381196, gc%: 43.72%

Download summary as .txt file: summary.txt

Total: 4 prophage regions have been identified, of which 2 regions are intact, 2 regions are incomplete, and 0 regions are questionable.

Region	Region Length	Completeness	Score	# Total Proteins	Region Position	Most Common Phage	GC %	Details
NODE_5_length_110593_cov_30.855919								
1	33.5Kb	intact	100	43	25315-58844	PHAGE_Brevib_Jimmer2_NC_041976(8)	45.16%	Show
NODE_19_length_67032_cov_45.236245								
2	39.7Kb	intact	100	65	1927-41674	PHAGE_Bacill_SPP1_NC_004166(15)	42.44%	Show
NODE_54_length_28375_cov_34.992424								
3	26.8Kb	incomplete	10	37	125-26978	PHAGE_Bacill_phi105_NC_004167(25)	41.75%	Show

En la figura 41B Organización genómica de la región intacta del profago de la cepa 91, realizada por PHASTER.

Figura 41B

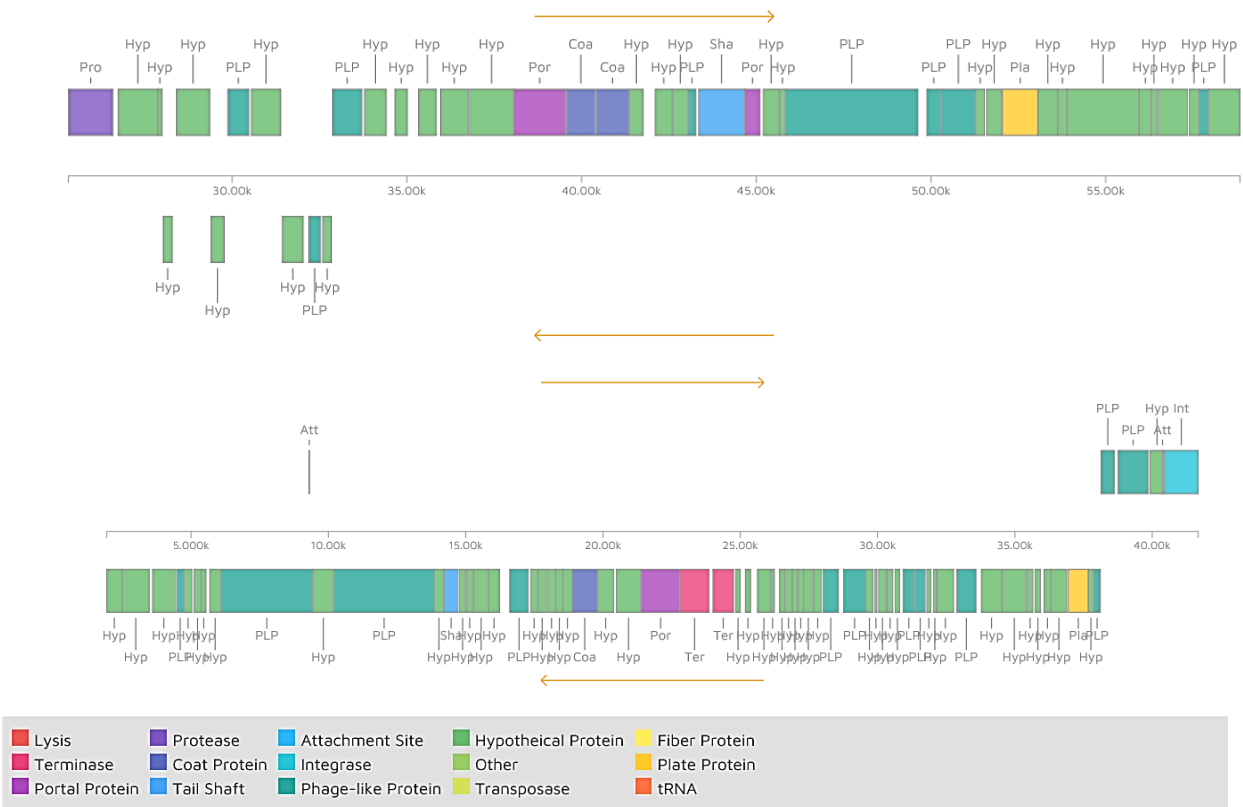


Figura 41B. Organización genómica de las regiones intactas de los profagos de la cepa 91, realizada por PHASTER.

En la figura 42 se muestran los profagos encontrados en la cepa 237.

Figura 42.

gi|000000000|ref|NC_000000| Genome; Raw sequence 5835471, gc%: 45.53%

Download summary as .txt file: [summary.txt](#)

Total: 5 prophage regions have been identified, of which 1 regions are intact, 4 regions are incomplete, and 0 regions are questionable.

Region	Region Length	Completeness	Score	# Total Proteins	Region Position	Most Common Phage	GC %	Details
NODE_11_length_104485_cov_17.198327								
1	50.6Kb	intact	150	78	51330-101995	PHAGE_Bacter_Lily_NC_028841(28)	45.21%	Show
NODE_38_length_45196_cov_24.663338								
2	20Kb	incomplete	30	17	23445-43515	PHAGE_Paenib_Fern_NC_028851(1)	42.99%	Show
NODE_54_length_33895_cov_22.634269								
3	20.2Kb	incomplete	20	24	11607-31820	PHAGE_Bacil_BalMu_1_NC_030945(9)	48.13%	Show
NODE_60_length_27492_cov_25.299360								

Figura 42. Presencia de profagos en la cepa 237.

En la figura 42B se muestra la organización genómica de la región intacta del profago de la cepa 237, realizada por PHASTER.

Figura 42B.

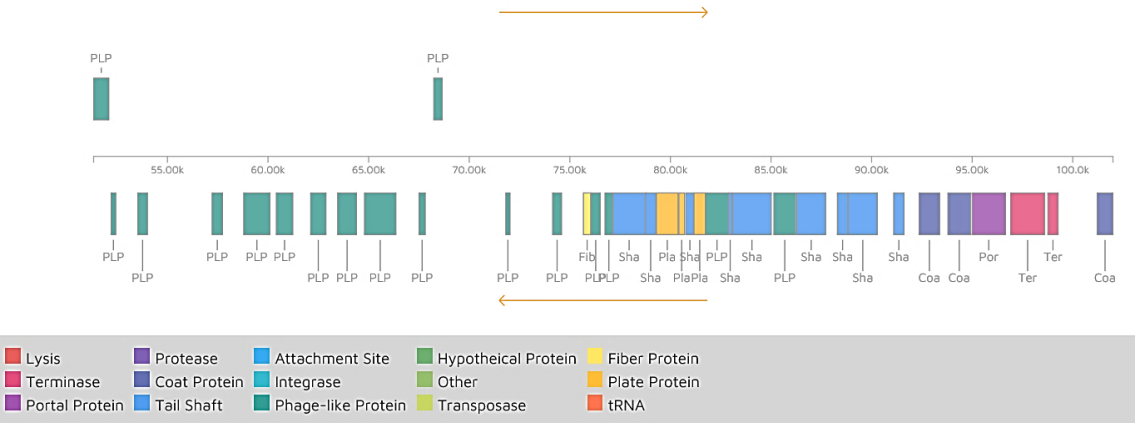


Figura 42B. Organización genómica de la región intacta del profago de la cepa 237, realizada por PHASTER.

Microscopía Electrónica de Transmisión.

Las microfotografías utilizando TEM mostraron en algunos casos que la inducción de fagos con Mitomicina C proporcionaba, junto con la lisis de la bacteria, un sustrato en el que buscar bacteriófagos.

Las fotografías muestran 2 partículas fágicas que coinciden con la morfología y el tamaño de fagos de la familia *Myoviridae* (Figura 43A) y *Siphoviridae* (Figura 43B) procedentes de la inducción con Mitomicina C de las cepas 97 y 103 respectivamente.

También se realizaron fotografías de las cepas secuenciadas. En la imagen 44 se muestran las cepas secuenciadas 237 (44A) y 107 (44B).

Figura 43.

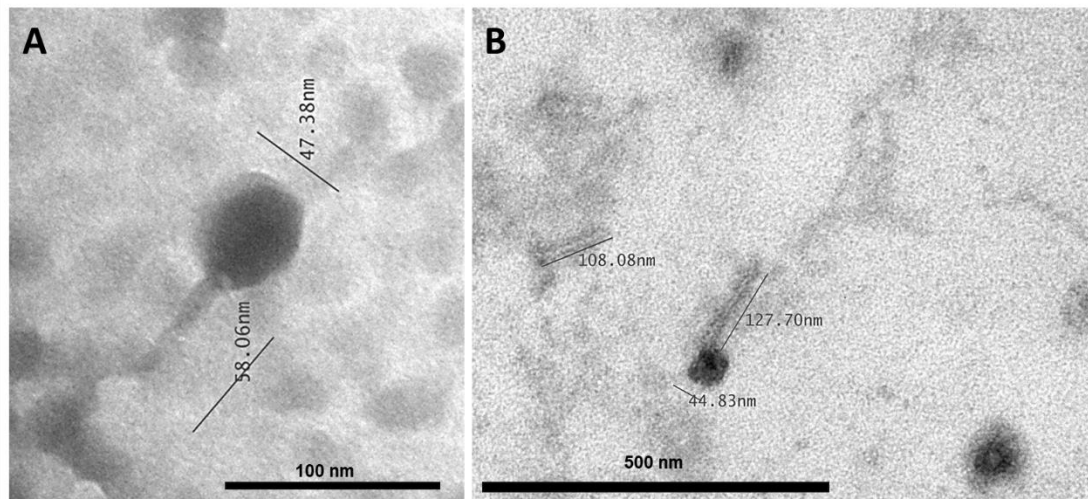


Figura 43. Morfología de fagos detectados en sobrenadantes de cultivos de cepas tratadas con Mitomicina C. La magnificación inicial fue de $\times 300.000$ aumentos (43A) y de $\times 120.000$ aumentos (43B). Las barras de escala indican 100 y 500 nm respectivamente.

Figura 44.

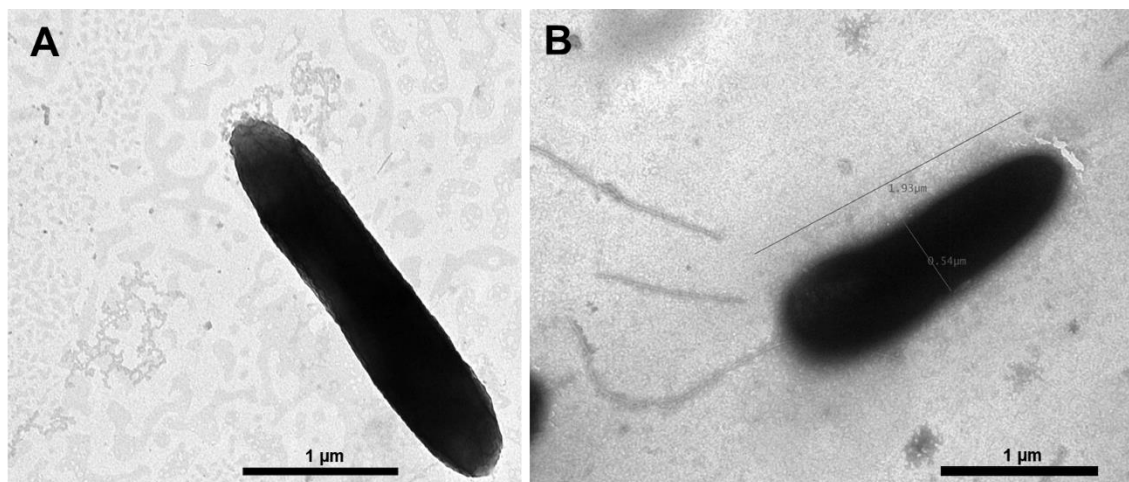


Figura 44. Microfotografía de TEM que muestra la morfología de varias de la cepas secuenciadas. A: cepa 237; B: cepa 107.

Discusión

Discusión

Búsqueda de bacterias en instalaciones de acuicultura

Es interesante conocer qué comunidades de bacterias se establecen en instalaciones dedicadas al cultivo de peces y moluscos. Por un lado, podemos así tener una noción de la diversidad de especies de bacterias que conviven con los peces, y por otro lado podemos intentar buscar entre ellas alguna o algunas que presenten características adecuadas para su utilización como probióticos, como bacterias centinela, o como bacterias productoras de compuestos de interés biosanitario o biotecnológico.

En el cribado que hemos realizado en las instalaciones de cultivo de dorada, lubina y medregal, y en algunos lugares presentes también en esas instalaciones, pero que no guardan una relación tan directa con el cultivo de peces, hemos encontrado varios cientos de cepas con características morfológicas variadas, lo que nos ha permitido hacer una selección amplia y posiblemente representativa, de bacterias cultivables presentes en esas instalaciones. Las bacterias fueron inicialmente seleccionadas en base a la morfología de sus colonias, presentando en algunos casos pigmentos llamativos y en otros, incluso mucosidad o rugosidad característica. Por supuesto, posiblemente alguna de las cepas seleccionadas pertenecen a la misma especie o incluso ser cepas idénticas, pero, hemos tratado de escoger aquellas que en la misma muestra presentaban morfologías bien diferenciadas. Esto no es incompatible con que incluso la misma cepa haya podido ser seleccionada en varios tipos de muestras, sin embargo, al proceder la selección de diferentes puntos, la probabilidad se reduce.

Uno de los factores a tener en cuenta a la hora de realizar una búsqueda de este tipo, es que hemos utilizado medios de cultivo generales, como el medio Luria. Hemos escogido este medio porque permite el aislamiento de un gran número de especies de bacterias ambientales. Un cribado más amplio quizás utilizaría medios de cultivo diferentes, pero también añadiría el problema de que el crecimiento específico en un medio puede variar la morfología de colonia en otros medios. De hecho, incluso bacterias que producen una pigmentación vistosa que permite su selección rápida, con los pases sucesivos o simplemente tras la congelación, pueden llegar a perder esos pigmentos, o cambiar de morfología, dependiendo del medio de cultivo que se utilice en cada caso.

También, hemos tenido en cuenta que muchos de los patógenos que hemos ensayado para observar fenómenos de antagonismo crecen fácilmente en medio LB. El medio general LB proporciona por tanto una ventaja a la hora de procesar las muestras, a la hora de su cultivo en medio líquido para su crecimiento, y para los ensayos de inhibición o antagonismo. Además, el medio LB es ideal para el crecimiento de *C. violaceum*, por lo que ha presentado varias ventajas en esta tesis.

El medio BHI y el medio TSB también son medios generales, aunque quizás más completos que el medio LB a la hora de favorecer el crecimiento de algunas bacterias. Simplemente, para el cribado inicial necesitábamos un medio general, no excesivamente rico, y que pudiera mantener el crecimiento tanto de cepas patógenas como de cepas ambientales.

Las cepas cultivadas y seleccionadas inicialmente crecen bien a la temperatura seleccionada, 26°C. A esta temperatura, tanto los patógenos de peces utilizados como *C. violaceum* muestran un crecimiento óptimo, a excepción claro de *S. iniae*, que tiene una forma de crecimiento lenta en medio sólido, y agregativa en medio líquido.

Seleccionar cepas de crecimiento por encima o por debajo de 26°C podría haber supuesto que los ensayos tuvieran que haberse realizado de forma heterogénea, buscando aquellos patógenos de peces que tuviesen temperaturas de crecimiento superiores o inferiores. Además, 26°C es una temperatura en la que muchos patógenos con temperaturas óptimas de 2 grados centígrados por encima o por debajo de 26°C no muestran diferencias significativas a la hora de formar biofilms o a la hora de crecer sobre los medios sólidos seleccionados. Por lo tanto, creemos que 26°C es una temperatura adecuada para buscar antagonistas de patógenos de peces que presentan un rango de temperatura de crecimiento entre 24°C y 28°C.

Además del medio de cultivo y de la temperatura de crecimiento, la salinidad es importante a la hora de buscar antagonistas contra patógenos de peces de agua salada. Todas las cepas que hemos ensayado contra *P. damsela* subsp. *piscicida* crecen en medio suplementado con un 1.5% de NaCl, por lo que las cepas que hemos seleccionado y almacenado pueden ser ensayadas también frente a otros patógenos que requieren este porcentaje de sal en el medio para su crecimiento. Esto se ve reflejado en los experimentos en los que hemos utilizado medio BHI suplementado con un 1.5% de sal.

Tras la selección inicial las cepas se congelaron a -80°C, pues probablemente se necesitarán en el futuro buscar otras características beneficiosas en esta colección de bacterias. Para los ensayos de antagonismo, estas cepas se descongelaron en numerosas

ocasiones, no mostrando una reducción de la viabilidad en prácticamente el 100% de ellas. Eso sí, muchas perdieron “lustrosidad” y dejaron de producir parcial o totalmente pigmentos característicos.

Los puntos de muestreo seleccionados en las instalaciones del Instituto ECOAQUA son por lo tanto lugares donde encontrar bacterias con propiedades interesantes contra patógenos de peces. Posiblemente uno de los factores que afectan a la presencia de estas poblaciones de bacterias sea el tipo de pez que se cultiva en los tanques. Así que creemos que si la especie de pez cultivada cambia, podrían volver a buscarse nuevas especies y cepas de bacterias para realizar ensayos similares a los de la presente tesis doctoral. Incluso sería interesante buscar bacterias con propiedades interesantes en estanques con especies acuáticas que no fueran peces, como moluscos, crustáceos o incluso tortugas marinas. Cuando se realizan búsquedas de bacterias en instalaciones donde se cultivan moluscos, crustáceos o incluso tortugas, la mayoría de investigaciones buscan sobre todo la presencia de patógenos de animales o humanos (Vieira et al., 2010; Koonse et al., 2005; Yu et al., 2013; Guz et al., 2021; Izadjoo et al., 1987). Pero las poblaciones de bacterias que se encuentran asociadas a ambientes donde viven esos animales son muy diversas y sería interesante realizar alguna aproximación para buscar fenotipos bacterianos de interés que no sean siempre patógenos (Díaz-Abad et al., 2022; McKnight et al., 2020; Nowakiewicz et al., 2015; Zhou et al., 2020; Wu et al., 2021; Babu et al., 2018).

Ensayos de antagonismo bacteriano

Los fenómenos de antagonismo bacteriano se conocen incluso desde épocas anteriores al descubrimiento de la Penicilina por Alexander Fleming. Durante la “época dorada” de los antibióticos -años en los que se descubrían incluso familias enteramente nuevas de antibióticos- la búsqueda de bacterias y hongos con antagonismo *in vitro* contra patógenos bacterianos fue la tónica habitual con la que producir nuevos fármacos. Las empresas farmacéuticas buscaban compuestos antimicrobianos en todos los lugares del mundo (Moellering, 2011; Klahn and Brönstrup, 2016; Leisner, 2020; Herrmann et al., 2016; Lewis, 2013). Poco a poco, con el aumento de la resistencia de las bacterias a los antibióticos las empresas farmacéuticas dejaron de invertir en programas de I+D para descubrir nuevos antimicrobianos. Esto ha sido así hasta tal punto que en el año 2022 menos de 5 grandes compañías farmacéuticas mantienen algún tipo de investigación

sobre la búsqueda de nuevas moléculas procedentes de microorganismos terrestres o acuáticos (Durrant, 2001; Fernandes and Martens, 2017; Bax and Green, 2015; Hunt and Kirsch, 2020).

En nuestro “screening”, hemos detectado numerosas combinaciones de bacterias ambientales y patógenos, donde se evidencia alguna forma de antagonismo. Esto no es poco habitual, pero nuestro objetivo era primero conocer qué bacterias hay en las instalaciones de acuicultura, y segundo encontrar al menos una que presentara buena actividad antibacteriana.

El modo de cribado es sencillo, y los cultivos de bacterias ambientales están en fase estacionaria, pues el ensayo se realiza con cultivos que ya han crecido durante al menos 48 horas en LB, lo que permite que expresen metabolitos secundarios y moléculas relacionadas con el estrés, algunas de las cuales pueden ser compuestos bacteriostáticos o bactericidas.

Una vez creado el césped del patógeno diana, solo hay que añadir unos microlitros de la bacteria ambiental para ver el efecto. Generalmente se puede apreciar inhibición -cuando la hay- a las 48 horas. En el caso de alargar el periodo de incubación, posiblemente el halo de inhibición pueda ser mayor, pero no hemos apreciado grandes diferencias respecto a realizar la medición de los halos a las 96 horas -o más-.

Muchas de las bacterias que producen halos de inhibición lo hacen frente a varios patógenos de peces. Esto es interesante porque su actividad puede facilitar su utilización contra varios de ellos -incluso Gram positivos o Gram negativos al mismo tiempo, emulando el espectro antimicrobiano amplio de algunos antibióticos. Concretamente, algunas de las cepas analizadas presentaron muy buena actividad contra *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* y *S. iniae*.

Estas cepas fueron candidatas para su secuenciación por la tecnología Illumina. Pudimos secuenciar el genoma completo de 8 de ellas, que parecían tener buena actividad contra distintas especies de patógenos de peces. La secuenciación masiva de cepas bacterianas, de coste económico cada vez menor, supone una gran ventaja a la hora de conocer a la bacteria que se quiere utilizar como probiótico, o simplemente, de la que se quiere extraer y utilizar un metabolito secundario o una actividad enzimática (Boolchandani et al., 2019; (A genomic approach to microbiology, 2019; Earl et al., 2008; Maghembe et al., 2020; Amini and Tavazoie, 2011).

Posible utilización como probióticos de algunas de las cepas caracterizadas

Uno de los géneros que presenta un número considerable de cepas probióticas es el género *Bacillus* (Kuebutornye et al., 2019; Abarike et al., 2018). En un trabajo previo, nuestro grupo de investigación aisló una cepa de *B. velezensis* (cepa D-18) con capacidad probiótica. Esta cepa fue aislada a partir de agua procedente de la canalización de salida de una instalación de cultivos marinos en Santander (Monzón-Atienza et al., 2021). Tras distintos ensayos, incluido uno de antagonismo frente a *V. anguillarum*, se estableció como candidato a probiótico, llegándose incluso a administrar en cultivos de lubina (*Dicentrarchus labrax*). En el presente trabajo, hemos aislado y secuenciado distintas especies de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Brevibacillus*, por lo que procederemos a realizar los estudios *in vivo* para evaluar su verdadera capacidad probiótica. El origen de estas cepas es también similar al de la cepa D-18 de *Bacillus velezensis*: instalaciones de acuicultura. Las propias instalaciones de acuicultura, aunque básicamente tienen unas características estructurales similares, poseen distintas variables que pueden dar origen a una diversidad notable de cepas probióticas. Esto es, el tipo de agua con sus parámetros físico-químicos, y el tipo de especies de pez cultivadas, con su microbiota asociada, como hemos comentado antes.

Las cepas de *Bacillus* poseen además unas características notables en cuanto a la producción de metabolitos, enzimas digestivas, factores de adherencia y compuestos antibióticos que favorecen la lucha contra patógenos y mejoran el desarrollo de los peces (Olmos et al., 2020; Farzanfar, 2006; Banerjee and Ray, 2017). En cuanto a los géneros *Paenibacillus* y *Brevibacillus*, son menos conocidos en acuicultura, pero también se han caracterizado algunas de cepas de *Paenibacillus* y *Brevibacillus* con capacidad probiótica (Grady et al., 2016). Así, se ha demostrado que varias cepas de *Paenibacillus polymyxa* mejoran varios parámetros biológicos de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) como la resistencia a patógenos o la tasa de crecimiento (Midhun Sebastian Jose et al., 2022). Una cepa de *P. polymyxa* también mostró antagonismo contra una batería de patógenos y no mostró toxicidad cuando fue inoculado en carpa (*Ctenopharyngodon idellus*) (Yan et al., 2017). Otro estudio, utilizando una cepa de *P. ehimensis* demostró que también se aumentaba la tasa de crecimiento de esta misma especie de pez -la tilapia del Nilo-, que

mostraba antagonismo frente a cepas de los patógenos de peces *A. hydrophila* y *S. iniae* (79).

En otro estudio, investigadores malayos mostraron que este tipo de cribados en busca de bacterias probióticas puede producir buenos resultados. En concreto, estos científicos hallaron un total 58 cepas de las especies *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. sphaericus*, *B. cereus*, *Brevibacillus brevis*, *Corynebacterium propinquum*, *Leifsonia aquatica* y *Paenibacillus macerans* con las que se realizaron posteriormente ensayos de antagonismo contra patógenos de peces. Todas ellas fueron aisladas de ambientes marinos, y presentaron buena eficacia a la hora de aumentar la producción de larvas y juveniles del mero tigre *Epinephelus fuscoguttatus* (Yasin et al., 2016). Finalmente, las cepas de *Bacillus* fueron las que presentaron mejores resultados.

Utilizando la platija estrellada (*Platichthys stellatus*) como animal de experimentación, investigadores coreanos probaron distintas combinaciones de cepas probióticas para valorar el efecto de estas sobre el crecimiento, y sobre distintos parámetros de la respuesta inmunitaria inespecífica. Las bacterias que utilizaron fueron de nuevo cepas de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* (Park et al., 2016). El patógeno contra el que ensayaron dichas combinaciones fue *Edwardsiella tarda*, y como resultado, estos investigadores aseveraron que en algunos casos la combinación de cepas puede mejorar el rendimiento, pero que otras ocasiones, una sola cepa es suficiente para conseguir mejorar ciertos parámetros que se estudian durante el crecimiento y las infecciones experimentales.

Investigadores de la India publicaron también un cribado similar de muestras ambientales (agua de mar, sedimentos, e intestinos de peces) en busca de bacterias con capacidad probiótica. En sus investigaciones aislaron un total de 109 bacterias entre las que destacaron algunas cepas de los géneros *Paenibacillus* y *Bacillus*. Estas cepas mostraron buena actividad antagonista contra cepas de *Vibrio* en un modelo de infección de camarón (*Penaeus monodon*) (Ravi et al., 2007).

De las cepas que hemos secuenciado, quizás las menos conocidas sean *Brevibacillus laterosporus*, *Rhodococcus aetherivorans* y *Bacillus atrophaeus*. No hay datos sobre la utilización de *Rhodococcus aetherivorans* y *Bacillus atrophaeus* como posibles probióticos en acuicultura. Respecto a *Brevibacillus laterosporus*, esta bacteria se ha utilizado para controlar poblaciones de algas, ya que posee propiedades alguicidas interesantes (Jia et al., 2014; Zhang et al., 2022), pero no se ha utilizado como probiótico o para realizar estudios de antagonismo con patógenos de peces.

Si bien es cierto que nuestro primer objetivo era aislar y caracterizar cepas probióticas de interés contra patógenos en acuicultura, no podemos descartar que alguna de las cepas seleccionadas posea además alguna capacidad metabólica que represente una ventaja para el desarrollo de los peces, solas o en combinación, o junto a otras cepas probióticas o compuestos prebióticos. Sin duda, estudios de campo que introduzcan estas cepas en la dieta de alguno de los tipos de pez que se cultivan en las Islas Canarias, como la dorada o la lubina, ofrecerá información adicional sobre la potencial utilización de estas cepas. Sería interesante realizar algún ensayo funcional con algunas de las cepas que presentan mayor actividad inhibitoria contra patógenos de peces para determinar la naturaleza de los productos que causan dicha inhibición.

Debemos tener en cuenta también la cepa del patógeno que utilizamos en los ensayos, ya que, al utilizar diferentes cepas, siempre existe la posibilidad de que alguna de ellas sea más susceptible a productos microbianos que otras. Esto lo hemos observado por ejemplo en *S. iniae*, donde las cepas 102508 y 103769 se han mostrado más resistentes en los ensayos de antagonismo que las cepas 105804 y IUSA-1.

QUORUM SENSING

Muchos fenotipos, incluyendo la formación de biocapas o biofilms, están bajo el control del Quorum-Sensing (QS) bacteriano. Este mecanismo de comunicación se basa en moléculas que difunden en el medio y que son conocidas como autoinductores. *C. violaceum* es una bacteria Gram negativa que produce de forma natural moléculas de violaceína en respuesta a la densidad de su población, que está a su vez relacionada con la presencia de acil homoserina lactonas de 6 átomos de carbono (C₆HSL). Estas moléculas de comunicación -o autoinductores- son quizás las más utilizadas en el mundo bacteriano (Blosser and Gray, 2000; McClean et al., 1997; Morohoshi et al., 2008).

A partir de esta especie, se han desarrollado cepas que son capaces de responder a determinadas moléculas de señalización bacteriana que se producen también cuando la densidad de población alcanza un umbral determinado. Cuando se alcanza este umbral, las bacterias coordinan la expresión de genes para la producción de diferentes proteínas, algunas de las cuales están implicadas en la virulencia. Algunos fenotipos de virulencia asociados a la producción de moléculas de QS son la producción de enzimas

extracelulares -como proteasas-, la formación de biofilms, la movilidad y la producción de toxinas (Waters and Bassler, 2005; Valente et al., 2017; Yan et al., 2022; Mukherjee et al., 2019; Natrah et al., 2012; Gao et al., 2018; Rasch et al., 2007; Law and Tan, 2022). Pero además, el QS están implicado en importante procesos bacterianos como la conjugación y la transformación, y también la resistencia a los antibióticos (Ng and Bassler, 2009; Santajit et al., 2022; Fan et al., 2022; Ruiz et al., 2022; Simanek and Paczkowski, 2022).

Por lo tanto, una estrategia anti-virulencia es inhibir esta vía de comunicación en las poblaciones bacterianas. De hecho, esta estrategia está siendo estudiada activamente también para luchar contra patógenos en acuicultura (Defoirdt, 2018; Zhao et al., 2015; Defoirdt et al., 2008; Srinivasan et al., 2020; Zhang et al., 2017; Alexpandi et al., 2021; Li et al., 2020).

Muchas moléculas presentes en productos naturales tienen actividad inhibitoria de algunas moléculas o mecanismos de QS bacterianos, el problema es que muchas veces los ensayos *in vitro* no pueden garantizar que las concentraciones a las que se prueban esos productos sean alcanzables *in vivo*. Un claro ejemplo son las moléculas obtenidas de plantas -con estudios publicados mayoritariamente por investigadores asiáticos-, como algunos aceites esenciales, que poseen una espectacular actividad *in vitro* pero luego no llegan a pruebas de concepto o a ensayos clínicos. De todas formas, cuando pensamos en compuestos antibacterianos -bactericidas o incluso bacteriostáticos- no debemos pensar solo en “medicamentos” sistémicos, ya que en algunas ocasiones, con inhibir la interacción de patógenos con superficies ya tendrían cierto interés para diversos tipos de industrias, por ejemplo, para la industria alimentaria (Rossi et al., 2022; Tariq et al., 2019; Zhang et al., 2020; Camele et al., 2019) o la medicina veterinaria (Omonijo et al., 2018; O'Bryan et al., 2015; Sharifi and Nayeri Fasaie, 2022; Dewi et al., 2021; Merghni et al., 2018).

Por ello, es interesante aislar e identificar bacterias que produzcan compuestos capaces de cortar estas vías de señalización, con el fin de reducir o inactivar dichos fenotipos de virulencia en las cepas diana. Muchos de estos compuestos se comportan de manera similar a los antibióticos producidos por las propias bacterias, con lo que la probabilidad de que puedan ser utilizados *in vivo* son mayores. El mecanismo de bloqueo de este tipo de señalización química en bacterias ha recibido el nombre de quorum-quenching (QQ). En contraposición al QS está el denominado quorum-quenching (QQ), un proceso encargado de romper esta comunicación a través de los autoinductores, y que puede ser

químico o enzimático (Sikdar and Elias, 2020; Grandclément et al., 2016) y que básicamente actúa degradando a los autoinductores.

En el presente trabajo, hemos encontrado al menos 40 cepas con actividad frente a la cepa de referencia de *C. violaceum*. En concreto, algunas de ellas, además de inhibir a esta bacteria, parece que bloquean la producción del pigmento violaceína, lo que lleva a pensar en el bloqueo concomitante de la ruta de Q-S que controla dicha molécula. Esto es evidente ya que el color morado oscuro de la cepa de *C. violaceum* se vuelve blanco, señal inequívoca de que se neutraliza la producción del pigmento.

Sería interesante encontrar nuevos inhibidores de esta ruta de señalización, y caracterizarlos a nivel molecular, ya que muchos de los factores de virulencia de la bacterias dependen de ella, sobre todo cuando se trata de bacterias resistentes a los antibióticos, y que han establecido nichos de supervivencia en ambientes donde se utilizan gran cantidad de estos medicamentos, como los hospitales en el caso de medicina humana, o sedimentos acuáticos de zonas en las que se utilizan masivamente los antibióticos para acuicultura. La secuenciación de las cepas que hemos encontrado con capacidad inhibitoria, podría mostrarnos los genes implicados en dicho proceso, pero muchos de ellos no tienen homólogos conocidos, sobre todo cuando se trata de especies relativamente poco estudiadas.

Por otra parte, es importante que las cepas que se vayan a utilizar como probióticos no contengan genes de virulencia o de resistencia a los antibióticos. La única cepa que presenta genes de resistencia con secuencias conservadas parece ser la cepa 241, con genes completos de resistencia a vancomicina. Las otras cepas, aunque tienen secuencias de genes que a priori son importantes, no parecen haber sido detectados en su secuencia completa por el programa de detección de genes de resistencia a antibióticos ResFinder. Esto hace más atractivas a las cepas a la hora de su posible utilización como probióticos.

Adherencia de las cepas aisladas en instalaciones de acuicultura

La adherencia es un requisito indispensable para establecer comunidades bacterianas tanto sobre sustratos inertes como sobre seres vivos. También es imprescindible para unirse a las células del hospedador. Por ello, la capacidad de adherencia es una cualidad deseable en las cepas destinadas a su utilización como probióticos. En el presente trabajo hemos utilizado el ensayo típico de biofilm sobre placas de poliestirenos para comprobar

la capacidad que tienen las cepas para formar biofilms. Como era de esperar, la heterogeneidad de las cepas aisladas ha permitido observar un abanico de fenotipos formadores de biopelículas en las placas de 24 pocillos. Debemos decir que este formato es muy adecuado para los ensayos, pues permite incluso realizar estudios de microscopía SEM dentro de los propios pocillos (Remuzgo-Martínez et al., 2015). Curiosamente, las cepas aisladas de materiales sólidos (cepas 1-192; biofilms en los tanques de cultivo, sedimentos) parecen tener mayor capacidad de adherencia que las cepas aisladas a partir de agua (cepas 193-276). Incluso, la densidad óptica en algunos casos ha tenido valores cercanos a 6 (DO 600nm). Esto implica que la capacidad de formar biopelículas por esas cepas en tan solo 48 horas bajo las condiciones experimentales que hemos utilizado, es enorme. Pero, debemos tener en cuenta, que a la vista del fenotipo dentro de los pocillos, está claro que esas cepas en su mayoría forman biopelículas en la superficie del medio. Esto puede variar enormemente el resultado cuantitativo, ya que esa película, que no es más que una capa tremendamente densa de bacterias flotando en el medio de cultivo, puede ser arrastrada o no en los ensayos de biofilm, cuando se realizan los lavados sucesivos. Este fenómeno ocurre en otras bacterias como *Acinetobacter baumannii* (Eijkelkamp et al., 2011; Longo et al., 2014) pero no quita que la capacidad de adherencia de esas cepas sea extraordinaria en este sustrato, arrastremos esa película en los lavados o no.

De las cepas secuenciadas, la que mayor capacidad tiene para formar biofilm *in vitro* es la cepa 237. De hecho, el biofilm que forma es más que notable. Seguidamente, tenemos las cepas 241, 238, y 253, que forman un biofilm bastante normal. Luego, con menor formación de biofilm tenemos las cepas 32, 91, 107 y 230. Es coherente pensar que estas bacterias tendrán tendencia a formar menos biofilm si tienen un modo de vida más planctónico, pero siempre debemos tener en cuenta las condiciones experimentales en las que desarrollamos nuestros ensayos. En general, el biofilm en prácticamente todas las cepas se formó en la interfase agua aire, aunque en algunas ocasiones se observaron células adheridas al fondo de los pocillos. Esto también parece cepa-dependiente, y sería un fenómeno que no estaría afectado por el medio de cultivo.

Presencia potencial de fagos en bacterias presentes en instalaciones de acuicultura

A pesar de esta enormidad de fagos que existe en el ambiente que nos rodea, la composición específica de las poblaciones de fagos en ambientes acuáticos y en las diferentes especies de peces está lejos de ser comprendida, ni tan siquiera parcialmente. Además, los esfuerzos científicos relacionados con el estudio de fagos en acuicultura, se han centrado casi exclusivamente en encontrar y caracterizar fagos contra patógenos de peces. Así, últimamente se estila lo que nosotros denominamos “un fago-un paper” donde los investigadores buscan, detectan, fotografían y secuencian nuevos fagos específicos de cepas patógenas de peces o moluscos. Pero, no se realiza un esfuerzo en la búsqueda y caracterización de fagos de bacterias autóctonas de ambientes acuáticos, que también pueden ofrecer una información valiosa sobre varios aspectos relevantes para las prácticas en acuicultura. Por ejemplo, conociendo las especies que portan fagos líticos podríamos llegar a plantear la posibilidad de utilizarlos para regular estas poblaciones, en el caso de que alguna cepa o especie sea más beneficiosa o más problemática en algún aspecto de su ecología.

En la presente tesis doctoral hemos iniciado un estudio prospectivo para la detección y caracterización de fagos relacionados con las especies de bacterias autóctonas que viven o están presentes en instalaciones relacionadas con la acuicultura. Hemos detectado que muchas de las cepas presentes en los tanques de peces asociadas a biofilm o en la propia agua poseen sensibilidad a la Mitomicina C.

Las curvas de crecimiento que cambian su tendencia cuando las bacterias se exponen a este compuesto son indicativas de la presencia potencial de un bacteriófago. Esto se ha demostrado con algunas de las especies de patógenos de peces que hemos utilizado, por ejemplo en *S. iniae* (Wright et al., 2013), *Hafnia* (Pan et al., 2022b) o distintas especies de *Vibrio* (Tabla 1), y también en otros patógenos animales o humanos como *Escherichia coli* (Fang et al., 2017). Un ejemplo claro en nuestros ensayos es la cepa 91 (figura 27B) Como hemos mencionado en el correspondiente apartado de resultados, de un total de las 180 cepas que se cultivaron para realizar ensayos con el inductor Mitomicina C, un total de 80 (44%) presentaron una desviación brusca del crecimiento exponencial durante los cultivos en medio líquido. Este porcentaje es similar al observado en diferentes estudios

con bacterias marinas, donde se llega a alcanzar una presencia de fagos hasta en el 62% de las cepas (Jiang and Paul, 1998; Williamson et al., 2002).

Para poder estudiar el fenómeno de lisis/lisogenia, en algunos casos en los que las curvas de tratamiento con Mitomicina indicaban claramente que este compuesto estaba induciendo una lisis fágica de la bacteria, procedimos a centrifugar y filtrar los sobrenadantes de los cultivos en busca de partículas fágicas. En muchas ocasiones, no tuvimos resultado, pero finalmente conseguimos fotografiar algunas estructuras similares a fagos de las familias *Myoviridae* y *Siphoviridae*. Estas morfologías son muy comunes en fagos de bacterias marinas y también en fagos de patógenos de peces. En la tabla 1 mostramos un claro ejemplo de ello.

Además, también hemos realizado microfotografías con TEM de algunas de las cepas secuenciadas, que resultaron tener la morfología típica de *Bacillus* en muchos casos.

Recientemente se han aislado fagos con un rango de hospedador relativamente amplio, por lo que sería interesante realizar experimentos de purificación de fagos directamente a partir de las cepas que han dado positivo en los experimentos de inducción con Mitomicina C para probarlos frente a cepas heterólogas.

De las cepas secuenciadas hemos obtenido el genoma completo de 4 bacteriófagos, que no presentan genes de resistencia o genes de virulencia bacterianos. La secuenciación de genomas de fagos se nos antoja hoy en día imprescindible para poder llevar a cabo su utilización en pruebas de campo.

Uno de los objetivos que nos planteamos para futuros trabajos, es buscar fagos líticos en nuestras colecciones de patógenos de peces utilizando el método de inducción con Mitomicina C. Además, también hay otra opción de obtener fagos líticos, utilizando el propio agua de las instalaciones de cultivo de peces para buscar fagos líticos contra patógenos de peces por el método de enriquecimiento.

Creemos que conocer las bacterias autóctonas que conviven con los peces en las piscifactorías, así como sus fagos, podrá ayudarnos a implementar medidas para favorecer la presencia de bacterias probióticas y perjudicar la presencia de bacterias patógenas. En esta tesis doctoral hemos implementado técnicas para continuar en ese camino.

Conclusiones

Conclusiones

1. Las instalaciones de acuicultura son una fuente importante de cepas bacterianas con propiedades probióticas.
2. Las cepas de bacterias aisladas en instalaciones de acuicultura poseen capacidades antimicrobianas y producen mecanismos de cloqueo de señales de Quorum-Sensing que podrían ser aprovechadas como herramientas anti-virulencia. Las cepas con mayor actividad frente a patógenos pertenecen a los géneros *Paenibacillus*, *Brevibacillus* y *Bacillus*.
3. Las cepas de bacterias aisladas en instalaciones de acuicultura presentan una adherencia heterogénea a la hora de realizar ensayos de formación de biofilms.
4. Según los resultados de los ensayos de inducción con Mitomicina C, aproximadamente el 50% de las cepas aisladas en las instalaciones de acuicultura del Instituto ECOAQUA podrían contener fagos.
6. La secuenciación de genomas de bacterias y fagos aisladas en las instalaciones del Instituto ECOAQUA establece que no poseen genes de virulencia ni de resistencia a antibióticos importantes, por lo que estas cepas podrían ser utilizadas como probióticos en acuicultura.

Bibliografía

Bibliografía

- A genomic approach to microbiology, 2019. . Nat Rev Genet 20, 311.
<https://doi.org/10.1038/s41576-019-0131-5>
- Abarike, E.D., Cai, J., Lu, Y., Yu, H., Chen, L., Jian, J., Tang, J., Jun, L., Kuebutornye, F.K.A., 2018. Effects of a commercial probiotic BS containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Shellfish Immunol 82, 229–238.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.037>
- Ackermann, H.-W., 2009. Phage classification and characterization. Methods Mol Biol 501, 127–140. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_13
- Ackermann, H.-W., 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. Arch Virol 152, 227–243. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1>
- Adams, A., 2019. Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. Fish Shellfish Immunol 90, 210–214. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.066>
- Adriaenssens, E.M., Edwards, R., Nash, J.H.E., Mahadevan, P., Seto, D., Ackermann, H.-W., Lavigne, R., Kropinski, A.M., 2015. Integration of genomic and proteomic analyses in the classification of the Siphoviridae family. Virology 477, 144–154.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.10.016>
- Adriaenssens, E.M., Farkas, K., McDonald, J.E., Jones, D.L., Allison, H.E., McCarthy, A.J., 2021. Tracing the fate of wastewater viruses reveals catchment-scale virome diversity and connectivity. Water Res 203, 117568.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117568>
- Akmal, M., Rahimi-Midani, A., Hafeez-Ur-Rehman, M., Hussain, A., Choi, T.-J., 2020. Isolation, Characterization, and Application of a Bacteriophage Infecting the Fish Pathogen *Aeromonas hydrophila*. Pathogens 9, 215.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9030215>
- Alexpandi, R., Abirami, G., Satish, L., Swasthikka, R.P., Krishnaveni, N., Jayakumar, R., Pandian, S.K., Veera Ravi, A., 2021. Tocopherol and phytol possess anti-quorum sensing mediated anti-infective behavior against *Vibrio campbellii* in aquaculture: An in vitro and in vivo study. Microb Pathog 161, 105221.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105221>

- Almeida, G.M.F., Laanto, E., Ashrafi, R., Sundberg, L.-R., 2019. Bacteriophage Adherence to Mucus Mediates Preventive Protection against Pathogenic Bacteria. *mBio* 10, e01984-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01984-19>
- Amagase, H., 2008. Current marketplace for probiotics: a Japanese perspective. *Clin Infect Dis* 46 Suppl 2, S73-75; discussion S144-151. <https://doi.org/10.1086/523338>
- Amini, S., Tavazoie, S., 2011. Antibiotics and the post-genome revolution. *Curr Opin Microbiol* 14, 513–518. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.017>
- Anand, T., Bera, B.C., Vaid, R.K., Barua, S., Riyesh, T., Virmani, N., Hussain, M., Singh, R.K., Tripathi, B.N., 2016. Abundance of antibiotic resistance genes in environmental bacteriophages. *J Gen Virol* 97, 3458–3466. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000639>
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2017. Selection and Transmission of Antibiotic-Resistant Bacteria. *Microbiol Spectr* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MTBP-0013-2016>
- Arndt, D., Grant, J.R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., Wishart, D.S., 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* 44, W16-21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M.I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T.H., Rasool, M.H., Shahid, A., Xueshan, X., Baloch, Z., 2021. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Front Cell Infect Microbiol* 11, 771510. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O., 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9, 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Babu, D.T., Archana, K., Kachiprath, B., Solomon, S., Jayanath, G., Singh, I.S.B., Philip, R., 2018. Marine actinomycetes as bioremediators in *Penaeus monodon* rearing system. *Fish Shellfish Immunol* 75, 231–242. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.01.037>

- Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V., 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol* 14, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006>
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol* 114, 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>
- Banerjee, G., Ray, A.K., 2017. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Res Vet Sci* 115, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.016>
- Bax, R., Green, S., 2015. Antibiotics: the changing regulatory and pharmaceutical industry paradigm. *J Antimicrob Chemother* 70, 1281–1284. <https://doi.org/10.1093/jac/dku572>
- Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., Larsson, D.G.J., 2018. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 42, fux053. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux053>
- Bertozi Silva, J., Storms, Z., Sauvageau, D., 2016. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiol Lett* 363, fnw002. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw002>
- Bettarel, Y., Combe, M., Adingra, A., Ndiaye, A., Bouvier, T., Panfili, J., Durand, J.-D., 2018. Hordes of Phages in the Gut of the Tilapia *Sarotherodon melanotheron*. *Sci Rep* 8, 11311. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29643-9>
- Biological Control of Fish Bacterial Pathogen, *Aeromonas hydrophila*, by Bacteriophage AH 1 [WWW Document], n.d. URL https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsfp1966/15/3-4/15_3-4_271/_article (accessed 1.9.23).
- Blosser, R.S., Gray, K.M., 2000. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. *J Microbiol Methods* 40, 47–55. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(99\)00136-0](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(99)00136-0)
- Boolchandani, M., D’Souza, A.W., Dantas, G., 2019. Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. *Nat Rev Genet* 20, 356–370. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0108-4>
- Braga, P.C., Dal Sasso, M., Maci, S., 1997. Cefodizime: effects of sub-inhibitory concentrations on adhesiveness and bacterial morphology of *Staphylococcus*

- aureus and *Escherichia coli*: comparison with cefotaxime and ceftriaxone. *J Antimicrob Chemother* 39, 79–84. <https://doi.org/10.1093/jac/39.1.79>
- Broendum, S.S., Buckle, A.M., McGowan, S., 2018a. Catalytic diversity and cell wall binding repeats in the phage-encoded endolysins. *Mol Microbiol* 110, 879–896. <https://doi.org/10.1111/mmi.14134>
- Broendum, S.S., Buckle, A.M., McGowan, S., 2018b. Catalytic diversity and cell wall binding repeats in the phage-encoded endolysins. *Mol Microbiol* 110, 879–896. <https://doi.org/10.1111/mmi.14134>
- Brudeseth, B.E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B.N., Lindmo, K., Løkling, K.-E., Bordevik, M., Steine, N., Klevan, A., Gravningen, K., 2013. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish Shellfish Immunol* 35, 1759–1768. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.029>
- Brum, J.R., Schenck, R.O., Sullivan, M.B., 2013. Global morphological analysis of marine viruses shows minimal regional variation and dominance of non-tailed viruses. *ISME J* 7, 1738–1751. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.67>
- Buschmann, A.H., Tomova, A., López, A., Maldonado, M.A., Henríquez, L.A., Ivanova, L., Moy, F., Godfrey, H.P., Cabello, F.C., 2012. Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. *PLoS One* 7, e42724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042724>
- Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Buschmann, A.H., Dölz, H.J., 2016. Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *Lancet Infect Dis* 16, e127–e133. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00100-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00100-6)
- Cahill, J., Young, R., 2019. Phage Lysis: Multiple Genes for Multiple Barriers. *Adv Virus Res* 103, 33–70. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.09.003>
- Camele, I., Elshafie, H.S., Caputo, L., De Feo, V., 2019. Anti-quorum Sensing and Antimicrobial Effect of Mediterranean Plant Essential Oils Against Phytopathogenic Bacteria. *Front Microbiol* 10, 2619. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02619>
- Cao, Y., Li, S., Wang, D., Zhao, J., Xu, L., Liu, H., Lu, T., Mou, Z., 2019. Genomic characterization of a novel virulent phage infecting the *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Virus Res* 273, 197764. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197764>

- Carrias, A., Welch, T.J., Waldbieser, G.C., Mead, D.A., Terhune, J.S., Liles, M.R., 2011. Comparative genomic analysis of bacteriophages specific to the channel catfish pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Virology* 8, 6. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-6>
- Castro-López, C., Pascacio-Villafán, C., Aluja, M., García, H.S., González-Córdova, A.F., Vallejo-Cordoba, B., Hernández-Mendoza, A., 2022. Safety Assessment of the Potential Probiotic Bacterium *Limosilactobacillus fermentum* J23 Using the Mexican Fruit Fly (*Anastrepha ludens* Loew, Diptera: Tephritidae) as a Novel In Vivo Model. *Probiotics Antimicrob Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-10034-6>
- Catalão, M.J., Gil, F., Moniz-Pereira, J., São-José, C., Pimentel, M., 2013. Diversity in bacterial lysis systems: bacteriophages show the way. *FEMS Microbiol Rev* 37, 554–571. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12006>
- Chan, B.K., Abedon, S.T., 2015. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. *Curr Pharm Des* 21, 85–99. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140905112311>
- Chandrarathna, H.P.S.U., Nikapitiya, C., Dananjaya, S.H.S., De Silva, B.C.J., Heo, G.-J., De Zoysa, M., Lee, J., 2020. Isolation and characterization of phage AHP-1 and its combined effect with chloramphenicol to control *Aeromonas hydrophila*. *Braz J Microbiol* 51, 409–416. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00178-z>
- Cheleuitte-Nieves, C., Heselpoth, R.D., Westblade, L.F., Lipman, N.S., Fischetti, V.A., 2020. Searching for a Bacteriophage Lysin to Treat *Corynebacterium bovis* in Immunocompromised Mice. *Comp Med* 70, 328–335. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-19-000096>
- Chen, L., Fan, J., Yan, T., Liu, Q., Yuan, S., Zhang, H., Yang, J., Deng, D., Huang, S., Ma, Y., 2019. Isolation and Characterization of Specific Phages to Prepare a Cocktail Preventing *Vibrio* sp. Va-F3 Infections in Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Front Microbiol* 10, 2337. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02337>
- Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., Shen, Y., Jin, Q., 2005. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res* 33, D325-328. <https://doi.org/10.1093/nar/gki008>
- Cheng, Y., Gao, D., Xia, Y., Wang, Z., Bai, M., Luo, K., Cui, X., Wang, Y., Zhang, S., Xiao, W., 2021. Characterization of Novel Bacteriophage AhyVDH1 and Its Lytic

- Activity Against *Aeromonas hydrophila*. *Curr Microbiol* 78, 329–337.
<https://doi.org/10.1007/s00284-020-02279-7>
- Christaki, E., Marcou, M., Tofarides, A., 2020. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol* 88, 26–40.
<https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>
- Christiansen, R.H., Dalsgaard, I., Middelboe, M., Lauritsen, A.H., Madsen, L., 2014. Detection and quantification of *Flavobacterium psychrophilum*-specific bacteriophages in vivo in rainbow trout upon oral administration: implications for disease control in aquaculture. *Appl Environ Microbiol* 80, 7683–7693.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02386-14>
- Colautti, A., Arnoldi, M., Comi, G., Iacumin, L., 2022. Antibiotic resistance and virulence factors in lactobacilli: something to carefully consider. *Food Microbiol* 103, 103934. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103934>
- Collignon, P.J., McEwen, S.A., 2019. One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Trop Med Infect Dis* 4, 22.
<https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010022>
- Crothers-Stomps, C., Høj, L., Bourne, D.G., Hall, M.R., Owens, L., 2010. Isolation of lytic bacteriophage against *Vibrio harveyi*. *J Appl Microbiol* 108, 1744–1750.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04578.x>
- Cui, H., Zhang, J., Cong, C., Wang, L., Li, X., Murtaza, B., Xu, Y., 2020. Complete genome analysis of the novel *Edwardsiella tarda* phage vB_EtaM_ET-ABTNL-9. *Arch Virol* 165, 1241–1244. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04600-y>
- Daniali, M., Nikfar, S., Abdollahi, M., 2020. Antibiotic resistance propagation through probiotics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 16, 1207–1215.
<https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1825682>
- Das, S., Ward, L.R., Burke, C., 2008. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 81, 419–429.
<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1731-8>
- Defoirdt, T., 2018. Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. *Trends Microbiol* 26, 313–328. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.005>
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P., 2008. Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *ISME J* 2, 19–26. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.92>

- Dewi, G., Nair, D.V.T., Peichel, C., Johnson, T.J., Noll, S., Kollanoor Johny, A., 2021. Effect of lemongrass essential oil against multidrug-resistant *Salmonella* Heidelberg and its attachment to chicken skin and meat. *Poult Sci* 100, 101116. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101116>
- D'Herelle, F., 2007. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Res Microbiol* 158, 553–554. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.07.005>
- Díaz-Abad, L., Bacco-Mannina, N., Miguel Madeira, F., Serrao, E.A., Regalla, A., Patrício, A.R., Frade, P.R., 2022. Red, Gold and Green: Microbial Contribution of Rhodophyta and Other Algae to Green Turtle (*Chelonia mydas*) Gut Microbiome. *Microorganisms* 10, 1988. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101988>
- Dion, M.B., Oechslin, F., Moineau, S., 2020. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat Rev Microbiol* 18, 125–138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
- Donati, V.L., Dalsgaard, I., Runtuvuori-Salmela, A., Kunttu, H., Jørgensen, J., Castillo, D., Sundberg, L.-R., Middelboe, M., Madsen, L., 2021. Interactions between Rainbow Trout Eyed Eggs and *Flavobacterium* spp. Using a Bath Challenge Model: Preliminary Evaluation of Bacteriophages as Pathogen Control Agents. *Microorganisms* 9, 971. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050971>
- Doron, S., Snyderman, D.R., 2015. Risk and safety of probiotics. *Clin Infect Dis* 60 Suppl 2, S129-134. <https://doi.org/10.1093/cid/civ085>
- Droubogiannis, S., Pavlidi, L., Tsertou, M.I., Kokkari, C., Skliros, D., Flemetakis, E., Katharios, P., 2022. *Vibrio* Phage Artemius, a Novel Phage Infecting *Vibrio alginolyticus*. *Pathogens* 11, 848. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080848>
- Duarte, J., Pereira, C., Costa, P., Almeida, A., 2021. Bacteriophages with Potential to Inactivate *Aeromonas hydrophila* in Cockles: In Vitro and In Vivo Preliminary Studies. *Antibiotics (Basel)* 10, 710. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060710>
- Dufourcq, R., Chalkiadakis, E., Fauchon, M., Deslandes, E., Kerjean, V., Chanteau, S., Petit, E., Guezennec, J., Dupont-Rouzeyrol, M., 2014. Isolation and partial characterization of bacteria (*Pseudoalteromonas* sp.) with potential antibacterial activity from a marine coastal environment from New Caledonia. *Lett Appl Microbiol* 58, 102–108. <https://doi.org/10.1111/lam.12162>

- Dunne, M., Hupfeld, M., Klumpp, J., Loessner, M.J., 2018. Molecular Basis of Bacterial Host Interactions by Gram-Positive Targeting Bacteriophages. *Viruses* 10, 397. <https://doi.org/10.3390/v10080397>
- Durrant, C., 2001. The responsibility of the pharmaceutical industry. *Clin Microbiol Infect* 7 Suppl 6, 2–4.
- Dutta, D., Kaushik, A., Kumar, D., Bag, S., 2021. Foodborne Pathogenic Vibrios: Antimicrobial Resistance. *Front Microbiol* 12, 638331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.638331>
- Earl, A.M., Losick, R., Kolter, R., 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol* 16, 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>
- Easwaran, M., Dananjaya, S.H.S., Park, S.C., Lee, J., Shin, H.-J., De Zoysa, M., 2017. Characterization of bacteriophage pAh-1 and its protective effects on experimental infection of *Aeromonas hydrophila* in Zebrafish (*Danio rerio*). *J Fish Dis* 40, 841–846. <https://doi.org/10.1111/jfd.12536>
- Echeverría-Vega, A., Morales-Vicencio, P., Saez-Saavedra, C., Ceh, J., Araya, R., 2016. The complete genome sequence and analysis of vB_VorS-PVo5, a *Vibrio* phage infectious to the pathogenic bacterium *Vibrio ordalii* ATCC-33509. *Stand Genomic Sci* 11, 45. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0166-6>
- Eijkelkamp, B.A., Stroehrer, U.H., Hassan, K.A., Papadimitriou, M.S., Paulsen, I.T., Brown, M.H., 2011. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol Lett* 323, 44–51. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02362.x>
- El Aamri, F., Real, F., Acosta, F., Acosta, B., Valdivia, J., Ramos-Vivas, J., Padilla, D., 2012. In vitro study of adherence, invasion, and persistence of *Streptococcus iniae* in fibroblastic-like fish cell line SAF-1. *J Aquat Anim Health* 24, 165–170. <https://doi.org/10.1080/08997659.2012.675928>
- El Aamri, F., Remuzgo-Martínez, S., Acosta, F., Real, F., Ramos-Vivas, J., Icardo, J.M., Padilla, D., 2015. Interactions of *Streptococcus iniae* with phagocytic cell line. *Microbes Infect* 17, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.06.006>
- Elmahdi, S., DaSilva, L.V., Parveen, S., 2016. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review. *Food Microbiol* 57, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.02.008>

- Elshaghabee, F.M.F., Rokana, N., Gulhane, R.D., Sharma, C., Panwar, H., 2017. *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Front Microbiol* 8, 1490. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>
- Escudeiro, P., Pothier, J., Dionisio, F., Nogueira, T., 2019. Antibiotic Resistance Gene Diversity and Virulence Gene Diversity Are Correlated in Human Gut and Environmental Microbiomes. *mSphere* 4, e00135-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00135-19>
- Fan, Q., Zuo, J., Wang, H., Grenier, D., Yi, L., Wang, Y., 2022. Contribution of quorum sensing to virulence and antibiotic resistance in zoonotic bacteria. *Biotechnol Adv* 59, 107965. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107965>
- Fang, Y., Mercer, R.G., McMullen, L.M., Gänzle, M.G., 2017. Induction of Shiga Toxin-Encoding Prophage by Abiotic Environmental Stress in Food. *Appl Environ Microbiol* 83, e01378-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01378-17>
- Farzanfar, A., 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunol Med Microbiol* 48, 149–158. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00116.x>
- Fattal, B., Dotan, A., Tchorsh, Y., Parpari, L., Shuval, H.I., 1988. Penetration of *E. coli* and F2 bacteriophage into fish tissues. *Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg* 78, 27–38.
- Feng, Y., Qin, Z., Geng, Y., Huang, X., Ouyang, P., Chen, D., Guo, H., Deng, H., Lai, W., Zuo, Z., Fang, J., Zhong, Z., 2022. Regional analysis of the characteristics and potential risks of bacterial pathogen resistance under high-pressure antibiotic application. *J Environ Manage* 317, 115481. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115481>
- Fernandes, P., Martens, E., 2017. Antibiotics in late clinical development. *Biochem Pharmacol* 133, 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.025>
- Fischetti, V.A., 2018. Development of Phage Lysins as Novel Therapeutics: A Historical Perspective. *Viruses* 10, 310. <https://doi.org/10.3390/v10060310>
- Fonseca, H.C., de Sousa Melo, D., Ramos, C.L., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2021. Probiotic Properties of Lactobacilli and Their Ability to Inhibit the Adhesion of Enteropathogenic Bacteria to Caco-2 and HT-29 Cells. *Probiotics Antimicrob Proteins* 13, 102–112. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09659-2>
- Gadoin, E., Desnues, C., Monteil-Bouchard, S., Bouvier, T., Auguet, J.-C., Roque d'Orbcastel, E., Bettarel, Y., 2021a. Fishing for the Virome of Tropical Tuna. *Viruses* 13, 1291. <https://doi.org/10.3390/v13071291>

- Gadoin, E., Durand, L., Guillou, A., Crochemore, S., Bouvier, T., Roque, E., Dagorn, L., Auguet, J.-C., Adingra, A., Desnues, C., Bettarel, Y., 2021b. Does the Composition of the Gut Bacteriome Change during the Growth of Tuna? *Microorganisms* 9, 1157. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061157>
- Gao, L., Ouyang, M., Li, Y., Zhang, H., Zheng, X.-F., Li, H.-X., Rao, S.-Q., Yang, Z.-Q., Gao, S., 2022. Isolation and Characterization of a Lytic Vibriophage OY1 and Its Biocontrol Effects Against *Vibrio* spp. *Front Microbiol* 13, 830692. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.830692>
- Gao, X., Wang, X., Mao, Q., Xu, R., Zhou, X., Ma, Y., Liu, Q., Zhang, Y., Wang, Q., 2018. VqsA, a Novel LysR-Type Transcriptional Regulator, Coordinates Quorum Sensing (QS) and Is Controlled by QS To Regulate Virulence in the Pathogen *Vibrio alginolyticus*. *Appl Environ Microbiol* 84, e00444-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00444-18>
- Gao, Y., Lu, Y., Dungait, J.A.J., Liu, J., Lin, S., Jia, J., Yu, G., 2022. The “Regulator” Function of Viruses on Ecosystem Carbon Cycling in the Anthropocene. *Front Public Health* 10, 858615. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.858615>
- Garin-Fernandez, A., Pereira-Flores, E., Glöckner, F.O., Wichels, A., 2018. The North Sea goes viral: Occurrence and distribution of North Sea bacteriophages. *Mar Genomics* 41, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2018.05.004>
- Gautier, M., Rouault, A., Sommer, P., Briandet, R., 1995. Occurrence of *Propionibacterium freudenreichii* bacteriophages in swiss cheese. *Appl Environ Microbiol* 61, 2572–2576. <https://doi.org/10.1128/aem.61.7.2572-2576.1995>
- Gerstmans, H., Grimon, D., Gutiérrez, D., Lood, C., Rodríguez, A., van Noort, V., Lammertyn, J., Lavigne, R., Briers, Y., 2020. A VersaTile-driven platform for rapid hit-to-lead development of engineered lysins. *Sci Adv* 6, eaaz1136. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz1136>
- Gerstmans, H., Rodríguez-Rubio, L., Lavigne, R., Briers, Y., 2016. From endolysins to Artilysin®s: novel enzyme-based approaches to kill drug-resistant bacteria. *Biochem Soc Trans* 44, 123–128. <https://doi.org/10.1042/BST20150192>
- Gerwick, W.H., Fenner, A.M., 2013. Drug discovery from marine microbes. *Microb Ecol* 65, 800–806. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0169-9>
- Gholizadeh, Y., Courvalin, P., 2000. Acquired and intrinsic glycopeptide resistance in enterococci. *Int J Antimicrob Agents* 16 Suppl 1, S11-17. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00300-9](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00300-9)

- Ghose, C., Euler, C.W., 2020. Gram-Negative Bacterial Lysins. *Antibiotics (Basel)* 9, 74. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020074>
- Ghosh, C., Sarkar, P., Issa, R., Haldar, J., 2019. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends Microbiol* 27, 323–338. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.010>
- Gonzalez-Franco, A.C., Robles-Hernández, L., 2022. Antagonist activities and phylogenetic relationships of actinomycetes isolated from an *Artemisia* habitat. *Rev Argent Microbiol* 54, 326–334. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.05.003>
- Grady, E.N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., Yuan, Z.-C., 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb Cell Fact* 15, 203. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>
- Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., Faure, D., 2016. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev* 40, 86–116. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv038>
- Gray, D.A., Wenzel, M., 2020. Multitarget Approaches against Multiresistant Superbugs. *ACS Infect Dis* 6, 1346–1365. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00001>
- Guerin, E., Hill, C., 2020. Shining Light on Human Gut Bacteriophages. *Front Cell Infect Microbiol* 10, 481. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00481>
- Gupta, S.K., Padmanabhan, B.R., Diene, S.M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L., Rolain, J.-M., 2014. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 212–220. <https://doi.org/10.1128/AAC.01310-13>
- Guz, L., Nowakiewicz, A., Puk, K., Zięba, P., Gnat, S., Matuszewski, Ł., 2021. Virulence and Antimicrobial Resistance Pattern of *Aeromonas* spp. Colonizing European Pond Turtles *Emys orbicularis* and Their Natural Environment. First Study from Poland. *Animals (Basel)* 11, 2772. <https://doi.org/10.3390/ani11102772>
- Harvey, E., Holmes, E.C., 2022. Diversity and evolution of the animal virome. *Nat Rev Microbiol* 20, 321–334. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00665-x>
- Hassan, E.S., Mahmoud, M.M., Kawato, Y., Nagai, T., Kawaguchi, O., Iida, Y., Yuasa, K., Nakai, T., 2012. Subclinical *Edwardsiella ictaluri* Infection of Wild Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathology* 47, 64–73. <https://doi.org/10.3147/jsfp.47.64>

- He, Y., Huang, Z., Zhang, X., Zhang, Z., Gong, M., Pan, X., Wei, D., Yang, H., 2019. Characterization of a novel lytic myophage, phiA8-29, infecting *Aeromonas* strains. *Arch Virol* 164, 893–896. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-4109-y>
- He, Y., Yang, H., 2015. The gastrointestinal phage communities of the cultivated freshwater fishes. *FEMS Microbiol Lett* 362, fnu027. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu027>
- Hernando-Amado, S., Coque, T.M., Baquero, F., Martínez, J.L., 2019. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat Microbiol* 4, 1432–1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>
- Herrmann, J., Lukežič, T., Kling, A., Baumann, S., Hüttel, S., Petković, H., Müller, R., 2016. Strategies for the Discovery and Development of New Antibiotics from Natural Products: Three Case Studies. *Curr Top Microbiol Immunol* 398, 339–363. https://doi.org/10.1007/82_2016_498
- Heselpoth, R.D., Euler, C.W., Schuch, R., Fischetti, V.A., 2019. Lysocins: Bioengineered Antimicrobials That Deliver Lysins across the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 63, e00342-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00342-19>
- Higuera, G., Bastías, R., Tsertsvadze, G., Romero, J., Espejo, R.T., 2013. Recently discovered *Vibrio anguillarum* phages can protect against experimentally induced vibriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 392–395, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.013>
- Hoang A, H., Tran T T, X., Le P, N., Dang T H, O., 2019. Selection of Phages to Control *Aeromonas hydrophila* - An Infectious Agent in Striped Catfish. *Biocontrol Sci* 24, 23–28. <https://doi.org/10.4265/bio.24.23>
- Hoang, H.A., Yen, M.H., Ngoan, V.T., Nga, L.P., Oanh, D.T.H., 2018. Virulent bacteriophage of *Edwardsiella ictaluri* isolated from kidney and liver of striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam. *Dis Aquat Organ* 132, 49–56. <https://doi.org/10.3354/dao03302>
- Hossain, A., Habibullah-Al-Mamun, M., Nagano, I., Masunaga, S., Kitazawa, D., Matsuda, H., 2022. Antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and resistance genes in aquaculture: risks, current concern, and future thinking. *Environ Sci Pollut Res Int* 29, 11054–11075. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17825-4>
- Hosseini, N., Paquet, V.E., Chehreghani, M., Moineau, S., Charette, S.J., 2021. Phage Cocktail Development against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*

- Strains Is Compromised by a Prophage. *Viruses* 13, 2241. <https://doi.org/10.3390/v13112241>
- Huang, C., Feng, C., Liu, X., Zhao, R., Wang, Z., Xi, H., Ou, H., Han, W., Guo, Z., Gu, J., Zhang, L., 2022. The Bacteriophage vB_CbrM_HP1 Protects Crucian Carp Against *Citrobacter braakii* Infection. *Front Vet Sci* 9, 888561. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.888561>
- Hunt, A., Kirsch, D.R., 2020. Decision making in the pharmaceutical industry - A tale of three antibiotics. *Int J Pharm* 581, 119251. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119251>
- Hyman, P., Abedon, S.T., 2010. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol* 70, 217–248. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70007-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70007-1)
- Imai, Y., Meyer, K.J., Iinishi, A., Favre-Godal, Q., Green, R., Manuse, S., Caboni, M., Mori, M., Niles, S., Ghiglieri, M., Honrao, C., Ma, X., Guo, J.J., Makriyannis, A., Linares-Otoya, L., Böhringer, N., Wuisan, Z.G., Kaur, H., Wu, R., Mateus, A., Typas, A., Savitski, M.M., Espinoza, J.L., O'Rourke, A., Nelson, K.E., Hiller, S., Noinaj, N., Schäberle, T.F., D'Onofrio, A., Lewis, K., 2019. A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens. *Nature* 576, 459–464. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1791-1>
- Imbeault, S., Parent, S., Lagacé, M., Uhland, C.F., Blais, J.-F., 2006. Using Bacteriophages to Prevent Furunculosis Caused by *Aeromonas salmonicida* in Farmed Brook Trout. *Journal of Aquatic Animal Health* 18, 203–214. <https://doi.org/10.1577/H06-019.1>
- Imhoff, J.F., Labes, A., Wiese, J., 2011. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. *Biotechnol Adv* 29, 468–482. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.03.001>
- Isolation and partial characterization of a bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*, 2010. . *AJMR* 4, 1794–1800. <https://doi.org/10.5897/AJMR.9000459>
- Isolation, identification and lysis properties analysis of a *Vibrio parahaemolyticus* phage VPP1-- 《Marine Sciences》 2013年01期 [WWW Document], n.d. URL https://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotol-HYKX201301016.htm (accessed 1.9.23).

- Izadjoo, M.J., Pantoja, C.O., Siebeling, R.J., 1987. Acquisition of *Salmonella* flora by turtle hatchlings on commercial turtle farms. *Can J Microbiol* 33, 718–724. <https://doi.org/10.1139/m87-125>
- Jia, K., Yang, N., Zhang, X., Cai, R., Zhang, Y., Tian, J., Raza, S.H.A., Kang, Y., Qian, A., Li, Y., Sun, W., Shen, J., Yao, J., Shan, X., Zhang, L., Wang, G., 2020. Genomic, Morphological and Functional Characterization of Virulent Bacteriophage IME-JL8 Targeting *Citrobacter freundii*. *Front Microbiol* 11, 585261. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585261>
- Jia, W., Huang, X., Li, C., 2014. A preliminary study of the algicidal mechanism of bioactive metabolites of *Brevibacillus laterosporus* on *Oscillatoria* in prawn ponds. *ScientificWorldJournal* 2014, 869149. <https://doi.org/10.1155/2014/869149>
- Jiang, S.C., Paul, J.H., 1998. Significance of Lysogeny in the Marine Environment: Studies with Isolates and a Model of Lysogenic Phage Production. *Microb Ecol* 35, 235–243. <https://doi.org/10.1007/s002489900079>
- Jose Priya, T.A., Kappalli, S., 2022. Modern biotechnological strategies for vaccine development in aquaculture - Prospects and challenges. *Vaccine* 40, 5873–5881. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.08.075>
- Jun, J.W., Kim, H.J., Yun, S.K., Chai, J.Y., Park, S.C., 2014. Eating oysters without risk of vibriosis: application of a bacteriophage against *Vibrio parahaemolyticus* in oysters. *Int J Food Microbiol* 188, 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.007>
- Jun, J.W., Kim, J.H., Shin, S.P., Han, J.E., Chai, J.Y., Park, S.C., 2013. Protective effects of the *Aeromonas* phages pAh1-C and pAh6-C against mass mortality of the cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 416–417, 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.045>
- Kalatzis, P.G., Bastías, R., Kokkari, C., Katharios, P., 2016. Isolation and Characterization of Two Lytic Bacteriophages, ϕ St2 and ϕ Grn1; Phage Therapy Application for Biological Control of *Vibrio alginolyticus* in Aquaculture Live Feeds. *PLoS One* 11, e0151101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151101>
- Karunasagar, Indrani, Shivu, M.M., Girisha, S.K., Krohne, G., Karunasagar, Iddya, 2007. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture, Larvi* 2005 268, 288–292. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.049>

- Katharios, P., Kalatzis, P.G., Kokkari, C., Sarropoulou, E., Middelboe, M., 2017. Isolation and characterization of a N4-like lytic bacteriophage infecting *Vibrio splendidus*, a pathogen of fish and bivalves. *PLoS One* 12, e0190083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190083>
- Kawato, Y., Istiqomah, I., Gaafar, A.Y., Hanaoka, M., Ishimaru, K., Yasuike, M., Nishiki, I., Nakamura, Y., Fujiwara, A., Nakai, T., 2020. A novel jumbo *Tenacibaculum maritimum* lytic phage with head-fiber-like appendages. *Arch Virol* 165, 303–311. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04485-6>
- Kawato, Y., Yasuike, M., Nakamura, Y., Shigenobu, Y., Fujiwara, A., Sano, M., Nakai, T., 2015. Complete genome sequence analysis of two *Pseudomonas plecoglossicida* phages, potential therapeutic agents. *Appl Environ Microbiol* 81, 874–881. <https://doi.org/10.1128/AEM.03038-14>
- Kennedy, J.E., Wei, C.I., Oblinger, J.L., 1986. Distribution of Coliphages in Various Foods. *J Food Prot* 49, 944–951. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-49.12.944>
- Khairnar, K., Raut, M.P., Chandekar, R.H., Sanmukh, S.G., Paunekar, W.N., 2013. Novel bacteriophage therapy for controlling metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* infection in catfish. *BMC Vet Res* 9, 264. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-264>
- Kibenge, F.S., 2019. Emerging viruses in aquaculture. *Curr Opin Virol* 34, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.008>
- Kiljunen, S., Hakala, K., Pinta, E., Huttunen, S., Pluta, P., Gador, A., Lönnberg, H., Skurnik, M., 2005. Yersiniophage phiR1-37 is a tailed bacteriophage having a 270 kb DNA genome with thymidine replaced by deoxyuridine. *Microbiology (Reading)* 151, 4093–4102. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28265-0>
- Kim, H.J., Jun, J.W., Giri, S.S., Chi, C., Yun, S., Kim, S.G., Kim, S.W., Kang, J.W., Han, S.J., Kwon, J., Oh, W.T., Park, S.C., 2019. Application of the bacteriophage pVco-14 to prevent *Vibrio coralliilyticus* infection in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *J Invertebr Pathol* 167, 107244. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107244>
- Kim, H.-J., Kim, Y.-T., Kim, H.B., Choi, S.H., Lee, J.-H., 2021. Characterization of bacteriophage VVP001 and its application for the inhibition of *Vibrio vulnificus* causing seafood-borne diseases. *Food Microbiol* 94, 103630. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103630>

- Kim, J.H., Gomez, D.K., Nakai, T., Park, S.C., 2010. Isolation and identification of bacteriophages infecting ayu *Plecoglossus altivelis altivelis* specific *Flavobacterium psychrophilum*. *Vet Microbiol* 140, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.002>
- Kim, Ji Hyung, Jun, J.W., Choresca, C.H., Shin, S.P., Han, J.E., Park, S.C., 2012a. Complete genome sequence of a novel marine siphovirus, pVp-1, infecting *Vibrio parahaemolyticus*. *J Virol* 86, 7013–7014. <https://doi.org/10.1128/JVI.00742-12>
- Kim, J. H., Son, J.S., Choi, Y.J., Choresca, C.H., Shin, S.P., Han, J.E., Jun, J.W., Kang, D.H., Oh, C., Heo, S.J., Park, S.C., 2012. Isolation and characterization of a lytic Myoviridae bacteriophage PAS-1 with broad infectivity in *Aeromonas salmonicida*. *Curr Microbiol* 64, 418–426. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0091-x>
- Kim, Ji Hyung, Son, J.S., Choi, Y.J., Choresca, C.H., Shin, S.P., Han, J.E., Jun, J.W., Park, S.C., 2012b. Complete genome sequence and characterization of a broad-host range T4-like bacteriophage phiAS5 infecting *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Vet Microbiol* 157, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.016>
- Kim, S.G., Giri, S.S., Yun, S., Kim, H.J., Kim, S.W., Kang, J.W., Han, S.J., Kwon, J., Jun, J.W., Oh, W.T., Park, S.C., 2020. Genomic characterization of bacteriophage pEt-SU, a novel phiKZ-related virus infecting *Edwardsiella tarda*. *Arch Virol* 165, 219–222. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04432-5>
- Klaenhammer, T.R., Kullen, M.J., 1999. Selection and design of probiotics. *Int J Food Microbiol* 50, 45–57. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00076-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00076-8)
- Klahn, P., Brönstrup, M., 2016. New Structural Templates for Clinically Validated and Novel Targets in Antimicrobial Drug Research and Development. *Curr Top Microbiol Immunol* 398, 365–417. https://doi.org/10.1007/82_2016_501
- Kokkari, C., Sarropoulou, E., Bastias, R., Mandalakis, M., Katharios, P., 2018. Isolation and characterization of a novel bacteriophage infecting *Vibrio alginolyticus*. *Arch Microbiol* 200, 707–718. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1480-8>
- König, G.M., Kehraus, S., Seibert, S.F., Abdel-Lateff, A., Müller, D., 2006. Natural products from marine organisms and their associated microbes. *Chembiochem* 7, 229–238. <https://doi.org/10.1002/cbic.200500087>

- Koonse, B., Burkhardt, W., Chirtel, S., Hoskin, G.P., 2005. Salmonella and the sanitary quality of aquacultured shrimp. *J Food Prot* 68, 2527–2532. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.12.2527>
- Koskella, B., Hernandez, C.A., Wheatley, R.M., 2022. Understanding the Impacts of Bacteriophage Viruses: From Laboratory Evolution to Natural Ecosystems. *Annu Rev Virol* 9, 57–78. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-075914>
- Krkosek, M., Lewis, M.A., Morton, A., Frazer, L.N., Volpe, J.P., 2006. Epizootics of wild fish induced by farm fish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15506–15510. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603525103>
- Kuebutornye, F.K.A., Abarike, E.D., Lu, Y., 2019. A review on the application of Bacillus as probiotics in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol* 87, 820–828. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.010>
- Kuebutornye, F.K.A., Lu, Y., Abarike, E.D., Wang, Z., Li, Y., Sakyi, M.E., 2020. In vitro Assessment of the Probiotic Characteristics of Three Bacillus Species from the Gut of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Probiotics Antimicrob Proteins* 12, 412–424. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09562-5>
- Kuhn, A., Thomas, J.A., 2022. The Beauty of Bacteriophage T4 Research: Lindsay W. Black and the T4 Head Assembly. *Viruses* 14, 700. <https://doi.org/10.3390/v14040700>
- Laanto, E., Bamford, J.K.H., Ravantti, J.J., Sundberg, L.-R., 2015. The use of phage FCL-2 as an alternative to chemotherapy against columnaris disease in aquaculture. *Front Microbiol* 6, 829. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00829>
- Laanto, E., Sundberg, L.-R., Bamford, J.K.H., 2011. Phage specificity of the freshwater fish pathogen *Flavobacterium columnare*. *Appl Environ Microbiol* 77, 7868–7872. <https://doi.org/10.1128/AEM.05574-11>
- Laborda, P., Sanz-García, F., Ochoa-Sánchez, L.E., Gil-Gil, T., Hernando-Amado, S., Martínez, J.L., 2022. Wildlife and Antibiotic Resistance. *Front Cell Infect Microbiol* 12, 873989. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.873989>
- Lafferty, K.D., Harvell, C.D., Conrad, J.M., Friedman, C.S., Kent, M.L., Kuris, A.M., Powell, E.N., Rondeau, D., Saksida, S.M., 2015. Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Ann Rev Mar Sci* 7, 471–496. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015646>

- Lal, T.M., Ransangan, J., 2015. Complete Genome Sequence of VpKK5, a Novel *Vibrio parahaemolyticus* Lytic Siphophage. *Genome Announc* 3, e01381-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01381-14>
- Lal, T.M., Sano, M., Hatai, K., Ransangan, J., 2016a. Complete genome sequence of a giant *Vibrio* phage ValKK3 infecting *Vibrio alginolyticus*. *Genom Data* 8, 37–38. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.03.002>
- Lal, T.M., Sano, M., Ransangan, J., 2017. Isolation and Characterization of Large Marine Bacteriophage (Myoviridae), VhKM4 Infecting *Vibrio harveyi*. *J Aquat Anim Health* 29, 26–30. <https://doi.org/10.1080/08997659.2016.1249578>
- Lal, T.M., Sano, M., Ransangan, J., 2016b. Genome characterization of a novel vibriophage VpKK5 (Siphoviridae) specific to fish pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Basic Microbiol* 56, 872–888. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500611>
- Lammie, S.L., Hughes, J.M., 2016. Antimicrobial Resistance, Food Safety, and One Health: The Need for Convergence. *Annu Rev Food Sci Technol* 7, 287–312. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033251>
- Larsson, D.G.J., Flach, C.-F., 2022. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol* 20, 257–269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Lavigne, R., Darius, P., Summer, E.J., Seto, D., Mahadevan, P., Nilsson, A.S., Ackermann, H.W., Kropinski, A.M., 2009. Classification of Myoviridae bacteriophages using protein sequence similarity. *BMC Microbiol* 9, 224. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-224>
- Lavigne, R., Seto, D., Mahadevan, P., Ackermann, H.-W., Kropinski, A.M., 2008. Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the Podoviridae using BLASTP-based tools. *Res Microbiol* 159, 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.03.005>
- Law, S.K.K., Tan, H.S., 2022. The role of quorum sensing, biofilm formation, and iron acquisition as key virulence mechanisms in *Acinetobacter baumannii* and the corresponding anti-virulence strategies. *Microbiol Res* 260, 127032. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127032>
- Lázaro-Díez, M., Remuzgo-Martínez, S., Rodríguez-Mirones, C., Acosta, F., Icardo, J.M., Martínez-Martínez, L., Ramos-Vivas, J., 2016. Effects of Subinhibitory Concentrations of Ceftaroline on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

- (MRSA) Biofilms. PLoS One 11, e0147569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147569>
- Le, T.S., Nguyen, T.H., Vo, H.P., Doan, V.C., Nguyen, H.L., Tran, M.T., Tran, T.T., Southgate, P.C., Kurtböke, D.İ., 2018. Protective Effects of Bacteriophages against *Aeromonas hydrophila* Species Causing Motile *Aeromonas* Septicemia (MAS) in Striped Catfish. Antibiotics (Basel) 7, 16. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7010016>
- Lee, H.S., Choi, S., Choi, S.H., 2012. Complete genome sequence of *Vibrio vulnificus* bacteriophage SSP002. J Virol 86, 7711. <https://doi.org/10.1128/JVI.00972-12>
- Lee, H.S., Choi, S., Shin, H., Lee, J.-H., Choi, S.H., 2014. *Vibrio vulnificus* bacteriophage SSP002 as a possible biocontrol agent. Appl Environ Microbiol 80, 515–524. <https://doi.org/10.1128/AEM.02675-13>
- Leisner, J.J., 2020. The Diverse Search for Synthetic, Semisynthetic and Natural Product Antibiotics From the 1940s and Up to 1960 Exemplified by a Small Pharmaceutical Player. Front Microbiol 11, 976. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00976>
- Leskinen, K., Pajunen, M.I., Vilanova, M.V.G.-R., Kiljunen, S., Nelson, A., Smith, D., Skurnik, M., 2020a. YerA41, a *Yersinia ruckeri* Bacteriophage: Determination of a Non-Sequencable DNA Bacteriophage Genome via RNA-Sequencing. Viruses 12, 620. <https://doi.org/10.3390/v12060620>
- Leskinen, K., Pajunen, M.I., Vilanova, M.V.G.-R., Kiljunen, S., Nelson, A., Smith, D., Skurnik, M., 2020b. YerA41, a *Yersinia ruckeri* Bacteriophage: Determination of a Non-Sequencable DNA Bacteriophage Genome via RNA-Sequencing. Viruses 12, 620. <https://doi.org/10.3390/v12060620>
- Leung, K.Y., Wang, Q., Yang, Z., Siame, B.A., 2019. *Edwardsiella piscicida*: A versatile emerging pathogen of fish. Virulence 10, 555–567. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1621648>
- Lewis, K., 2013. Platforms for antibiotic discovery. Nat Rev Drug Discov 12, 371–387. <https://doi.org/10.1038/nrd3975>
- Li, N., Yu, H., Liu, H., Wang, Y., Zhou, J., Ma, X., Wang, Z., Sun, C., Qiao, S., 2019. Horizontal transfer of *vanA* between probiotic *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in fermented soybean meal and in digestive tract of growing pigs. J Anim Sci Biotechnol 10, 36. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0341-x>

- Li, T., Sun, X., Chen, H., He, B., Mei, Y., Wang, D., Li, J., 2020. Methyl anthranilate: A novel quorum sensing inhibitor and anti-biofilm agent against *Aeromonas sobria*. *Food Microbiol* 86, 103356. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103356>
- Li, Z., Li, X., Zhang, J., Wang, X., Wang, L., Cao, Z., Xu, Y., 2016. Use of phages to control *Vibrio splendidus* infection in the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 54, 302–311. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.026>
- Lilly, D.M., Stillwell, R.H., 1965. PROBIOTICS: GROWTH-PROMOTING FACTORS PRODUCED BY MICROORGANISMS. *Science* 147, 747–748. <https://doi.org/10.1126/science.147.3659.747>
- Lin, H., Paff, M.L., Molineux, I.J., Bull, J.J., 2018. Antibiotic Therapy Using Phage Depolymerases: Robustness Across a Range of Conditions. *Viruses* 10, 622. <https://doi.org/10.3390/v10110622>
- Lin, L.-C., Tsai, Y.-C., 2022. Isolation and characterization of a *Vibrio owensii* phage phi50-12. *Sci Rep* 12, 16390. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20831-2>
- Liu, J., Gao, S., Dong, Y., Lu, C., Liu, Y., 2020. Isolation and characterization of bacteriophages against virulent *Aeromonas hydrophila*. *BMC Microbiol* 20, 141. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01811-w>
- Livny, J., Larock, C.N., Friedman, D.I., 2009. Identification and isolation of lysogens with induced prophage. *Methods Mol Biol* 501, 253–265. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_22
- Loessner, M.J., 2005. Bacteriophage endolysins--current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol* 8, 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.002>
- Lomelí-Ortega, C.O., Martínez-Sández, A.J., Barajas-Sandoval, D.R., Reyes, A.G., Magallón-Barajas, F., Veyrand-Quíros, B., Gannon, L., Harrison, C., Michniewski, S., Millard, A., Quiroz-Guzmán, E., 2021. Isolation and characterization of vibriophage vB_Vc_SrVc9: an effective agent in preventing *Vibrio campbellii* infections in brine shrimp nauplii (*Artemia franciscana*). *J Appl Microbiol* 131, 36–49. <https://doi.org/10.1111/jam.14937>
- Longo, F., Vuotto, C., Donelli, G., 2014. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol* 37, 119–127.
- Łoś, M., Węgrzyn, G., 2012. Pseudolysogeny. *Adv Virus Res* 82, 339–349. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394621-8.00019-4>

- Luo, E., Aylward, F.O., Mende, D.R., DeLong, E.F., 2017. Bacteriophage Distributions and Temporal Variability in the Ocean's Interior. *mBio* 8, e01903-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01903-17>
- Maghembe, R., Damian, D., Makaranga, A., Nyandoro, S.S., Lyantagaye, S.L., Kusari, S., Hatti-Kaul, R., 2020. Omics for Bioprospecting and Drug Discovery from Bacteria and Microalgae. *Antibiotics (Basel)* 9, 229. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050229>
- Mäntynen, S., Laanto, E., Oksanen, H.M., Poranen, M.M., Díaz-Muñoz, S.L., 2021. Black box of phage-bacterium interactions: exploring alternative phage infection strategies. *Open Biol* 11, 210188. <https://doi.org/10.1098/rsob.210188>
- Matamp, N., Bhat, S.G., 2020. Genome characterization of novel lytic Myoviridae bacteriophage ϕ VP-1 enhances its applicability against MDR-biofilm-forming *Vibrio parahaemolyticus*. *Arch Virol* 165, 387–396. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04493-6>
- Matsuzaki, S., Inoue, T., Tanaka, S., Koga, T., Kuroda, M., Kimura, S., Imai, S., 2000. Characterization of a novel *Vibrio parahaemolyticus* phage, KVP241, and its relatives frequently isolated from seawater. *Microbiol Immunol* 44, 953–956. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2000.tb02589.x>
- Matsuzaki, S., Tanaka, S., Koga, T., Kawata, T., 1992. A broad-host-range vibriophage, KVP40, isolated from sea water. *Microbiol Immunol* 36, 93–97. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1992.tb01645.x>
- McArthur, A.G., Wagglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M.A., Baylay, A.J., Bhullar, K., Canova, M.J., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A.M., Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M.R., O'Brien, J.S., Pawlowski, A.C., Piddock, L.J.V., Spanogiannopoulos, P., Sutherland, A.D., Tang, I., Taylor, P.L., Thaker, M., Wang, W., Yan, M., Yu, T., Wright, G.D., 2013. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 3348–3357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>
- McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., Williams, P., 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology (Reading)* 143 (Pt 12), 3703–3711. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703>

- McEwen, S.A., Collignon, P.J., 2018. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr* 6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
- McKnight, D.T., Zenger, K.R., Alford, R.A., Huerlimann, R., 2020. Microbiome diversity and composition varies across body areas in a freshwater turtle. *Microbiology (Reading)* 166, 440–452. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000904>
- Meng, Xiangpeng, Shi, Y., Ji, W., Meng, Xueling, Zhang, J., Wang, H., Lu, C., Sun, J., Yan, Y., 2011. Application of a bacteriophage lysin to disrupt biofilms formed by the animal pathogen *Streptococcus suis*. *Appl Environ Microbiol* 77, 8272–8279. <https://doi.org/10.1128/AEM.05151-11>
- Merghni, A., Noumi, E., Hadded, O., Dridi, N., Panwar, H., Ceylan, O., Mastouri, M., Snoussi, M., 2018. Assessment of the antibiofilm and antiquorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* essential oil and its main component 1,8-cineole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Microb Pathog* 118, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.006>
- Midhun Sebastian Jose, null, Arun, D., Neethu, S., Radhakrishnan, E.K., Jyothis, M., 2022. Probiotic *Paenibacillus polymyxa* HGA4C and *Bacillus licheniformis* HGA8B combination improved growth performance, enzymatic profile, gene expression and disease resistance in *Oreochromis niloticus*. *Microb Pathog* 174, 105951. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105951>
- Miranda, C.D., Godoy, F.A., Lee, M.R., 2018. Current Status of the Use of Antibiotics and the Antimicrobial Resistance in the Chilean Salmon Farms. *Front Microbiol* 9, 1284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01284>
- Mizuno, C.M., Ghai, R., Saghai, A., López-García, P., Rodriguez-Valera, F., 2016. Genomes of Abundant and Widespread Viruses from the Deep Ocean. *mBio* 7, e00805-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00805-16>
- Moellering, R.C., 2011. Discovering new antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents* 37, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.08.018>
- Mondal, H., Thomas, J., 2022. A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture. *Aquac Int* 30, 1971–2000. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00884-w>
- Monzón-Atienza, L., Bravo, J., Torrecillas, S., Montero, D., Canales, A.F.G., de la Banda, I.G., Galindo-Villegas, J., Ramos-Vivas, J., Acosta, F., 2021. Isolation and Characterization of a *Bacillus velezensis* D-18 Strain, as a Potential Probiotic in

- European Seabass Aquaculture. *Probiotics Antimicrob Proteins* 13, 1404–1412.
<https://doi.org/10.1007/s12602-021-09782-8>
- Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N., Ikeda, T., 2008. N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiol Lett* 279, 124–130.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01016.x>
- Mukherjee, S., Jemielita, M., Stergioula, V., Tikhonov, M., Bassler, B.L., 2019. Photosensing and quorum sensing are integrated to control *Pseudomonas aeruginosa* collective behaviors. *PLoS Biol* 17, e3000579.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000579>
- Munang'andu, H.M., Evensen, Ø., 2019. Correlates of protective immunity for fish vaccines. *Fish Shellfish Immunol* 85, 132–140.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.060>
- Mushegian, A.R., 2020. Are There 10³¹ Virus Particles on Earth, or More, or Fewer? *J Bacteriol* 202, e00052-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00052-20>
- Nagel, T., Musila, L., Muthoni, M., Nikolich, M., Nakavuma, J.L., Clokie, M.R., 2022. Phage banks as potential tools to rapidly and cost-effectively manage antimicrobial resistance in the developing world. *Curr Opin Virol* 53, 101208.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2022.101208>
- Natrah, F.M.I., Alam, M.I., Pawar, S., Harzevili, A.S., Nevejan, N., Boon, N., Sorgeloos, P., Bossier, P., Defoirdt, T., 2012. The impact of quorum sensing on the virulence of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida* towards burbot (*Lota lota* L.) larvae. *Vet Microbiol* 159, 77–82.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.014>
- Ng, W.-L., Bassler, B.L., 2009. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* 43, 197–222. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134304>
- Nguyen, H.N.K., Van, T.T.H., Nguyen, H.T., Smooker, P.M., Shimeta, J., Coloe, P.J., 2014. Molecular characterization of antibiotic resistance in *Pseudomonas* and *Aeromonas* isolates from catfish of the Mekong Delta, Vietnam. *Vet Microbiol* 171, 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.028>
- Nguyen, T.-T., Xuan, T.T.T., Ngoc, T.H., Duyen, L.T.M., Vinh, T.Q., My, P.D.T., Hoang, H.A., Nga, L.P., 2021. Diverse Bacteriophages Infecting the Bacterial Striped Catfish Pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Microorganisms* 9, 1830.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9091830>

- Nhung, N.T., Cuong, N.V., Thwaites, G., Carrique-Mas, J., 2016. Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance in Animal Production in Southeast Asia: A Review. *Antibiotics (Basel)* 5, 37. <https://doi.org/10.3390/antibiotics5040037>
- Nikapitiya, C., Chandrarathna, H.P.S.U., Dananjaya, S.H.S., De Zoysa, M., Lee, J., 2020. Isolation and characterization of phage (ETP-1) specific to multidrug resistant pathogenic *Edwardsiella tarda* and its in vivo biocontrol efficacy in zebrafish (*Danio rerio*). *Biologicals* 63, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.12.006>
- Ninawe, A.S., Selvin, J., 2009. Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and challenges. *Crit Rev Microbiol* 35, 43–66. <https://doi.org/10.1080/10408410802667202>
- Nnadozie, C.F., Odume, O.N., 2019. Freshwater environments as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and their role in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Environ Pollut* 254, 113067. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113067>
- Nowakiewicz, A., Ziółkowska, G., Zięba, P., Dziedzic, B.M., Gnat, S., Wójcik, M., Dziedzic, R., Kostruba, A., 2015. Aerobic bacterial microbiota isolated from the cloaca of the European pond turtle (*Emys orbicularis*) in Poland. *J Wildl Dis* 51, 255–259. <https://doi.org/10.7589/2013-07-157>
- Nuidate, T., Kuaphiriyakul, A., Surachat, K., Mittraparp-Arthorn, P., 2021. Induction and Genome Analysis of HY01, a Newly Reported Prophage from an Emerging Shrimp Pathogen *Vibrio campbellii*. *Microorganisms* 9, 400. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020400>
- Oakey, H.J., Owens, L., 2000. A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia. *J Appl Microbiol* 89, 702–709. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01169.x>
- O'Bryan, C.A., Pendleton, S.J., Crandall, P.G., Ricke, S.C., 2015. Potential of Plant Essential Oils and Their Components in Animal Agriculture - in vitro Studies on Antibacterial Mode of Action. *Front Vet Sci* 2, 35. <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00035>
- Olmos, J., Acosta, M., Mendoza, G., Pitones, V., 2020. *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. *Arch Microbiol* 202, 427–435. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01757-2>

- Omonijo, F.A., Ni, L., Gong, J., Wang, Q., Lahaye, L., Yang, C., 2018. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Anim Nutr* 4, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.001>
- Onarinde, B.A., Dixon, R.A., 2018. Prospects for Biocontrol of *Vibrio parahaemolyticus* Contamination in Blue Mussels (*Mytilus edulus*)-A Year-Long Study. *Front Microbiol* 9, 1043. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01043>
- O'Toole, G.A., Kolter, R., 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28, 449–461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
- Padilla, D., Acosta Hernández, B., Ramos Vivas, J., Déniz, S., Rosario, I., Martín Barrasa, J.L., Henao, A.S., Silva Sergeant, F., Ramos Sosa, M.J., García Álvarez, N., Real, F., 2022. Kinetics of the invasion of a non-phagocytic fish cell line, RTG-2 by *Yersinia ruckeri* serotype O1 biotype 1. *Acta Vet Hung.* <https://doi.org/10.1556/004.2022.00013>
- Pan, L., Li, D., Lin, W., Liu, W., Qu, C., Qian, M., Cai, R., Zhou, Q., Wang, F., Tong, Y., 2022a. Novel *Aeromonas* Phage Ahy-Yong1 and Its Protective Effects against *Aeromonas hydrophila* in Brocade Carp (*Cyprinus* aka Koi). *Viruses* 14, 2498. <https://doi.org/10.3390/v14112498>
- Pan, L., Li, D., Tong, Y., Lin, W., Qin, W., Xu, L., Zhan, P., 2022b. Induction and Genomic Analysis of a Lysogenic Phage of *Hafnia paralvei*. *Curr Microbiol* 79, 50. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02698-0>
- Park, S.C., Shimamura, I., Fukunaga, M., Mori, K.I., Nakai, T., 2000. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Appl Environ Microbiol* 66, 1416–1422. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1416-1422.2000>
- Park, Y., Moniruzzaman, M., Lee, S., Hong, J., Won, S., Lee, J.M., Yun, H., Kim, K.-W., Ko, D., Bai, S.C., 2016. Comparison of the effects of dietary single and multi-probiotics on growth, non-specific immune responses and disease resistance in starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Fish Shellfish Immunol* 59, 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.006>
- Pepi, M., Focardi, S., 2021. Antibiotic-Resistant Bacteria in Aquaculture and Climate Change: A Challenge for Health in the Mediterranean Area. *Int J Environ Res Public Health* 18, 5723. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115723>

- Petrov, V.M., Karam, J.D., 2004. Diversity of structure and function of DNA polymerase (gp43) of T4-related bacteriophages. *Biochemistry (Mosc)* 69, 1213–1218. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0066-7>
- Pham, T.M., Wiese, J., Wenzel-Storjohann, A., Imhoff, J.F., 2016. Diversity and antimicrobial potential of bacterial isolates associated with the soft coral *Alcyonium digitatum* from the Baltic Sea. *Antonie Van Leeuwenhoek* 109, 105–119. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0613-1>
- Pietilä, M.K., Demina, T.A., Atanasova, N.S., Oksanen, H.M., Bamford, D.H., 2014. Archaeal viruses and bacteriophages: comparisons and contrasts. *Trends Microbiol* 22, 334–344. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.02.007>
- Pires, D.P., Oliveira, H., Melo, L.D.R., Sillankorva, S., Azeredo, J., 2016. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 2141–2151. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7247-0>
- Prasad, Y., Arpana, null, Kumar, D., Sharma, A.K., 2011. Lytic bacteriophages specific to *Flavobacterium columnare* rescue catfish, *Clarias batrachus* (Linn.) from columnaris disease. *J Environ Biol* 32, 161–168.
- Preena, P.G., Swaminathan, T.R., Rejish Kumar, V.J., Bright Singh, I.S., 2020. Unravelling the menace: detection of antimicrobial resistance in aquaculture. *Lett Appl Microbiol* 71, 26–38. <https://doi.org/10.1111/lam.13292>
- Pruden, A., Larsson, D.G.J., Amézquita, A., Collignon, P., Brandt, K.K., Graham, D.W., Lazorchak, J.M., Suzuki, S., Silley, P., Snape, J.R., Topp, E., Zhang, T., Zhu, Y.-G., 2013. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ Health Perspect* 121, 878–885. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206446>
- Quijada, N.M., Rodríguez-Lázaro, D., Eiros, J.M., Hernández, M., 2019. TORMES: an automated pipeline for whole bacterial genome analysis. *Bioinformatics* 35, 4207–4212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz220>
- Raghu Patil, J., Desai, S.N., Roy, P., Durgaiyah, M., Saravanan, R.S., Vipra, A., 2014. Simulated hatchery system to assess bacteriophage efficacy against *Vibrio harveyi*. *Dis Aquat Organ* 112, 113–119. <https://doi.org/10.3354/dao02806>
- Ramos-Vivas, J., Elexpuru-Zabaleta, M., Samano, M.L., Barrera, A.P., Forbes-Hernández, T.Y., Giampieri, F., Battino, M., 2021a. Phages and Enzybiotics in

- Food Biopreservation. Molecules 26, 5138.
<https://doi.org/10.3390/molecules26175138>
- Ramos-Vivas, J., Superio, J., Galindo-Villegas, J., Acosta, F., 2021b. Phage Therapy as a Focused Management Strategy in Aquaculture. *Int J Mol Sci* 22, 10436.
<https://doi.org/10.3390/ijms221910436>
- Rasch, M., Kastbjerg, V.G., Bruhn, J.B., Dalsgaard, I., Givskov, M., Gram, L., 2007. Quorum sensing signals are produced by *Aeromonas salmonicida* and quorum sensing inhibitors can reduce production of a potential virulence factor. *Dis Aquat Organ* 78, 105–113. <https://doi.org/10.3354/dao01865>
- Ravi, A.V., Musthafa, K.S., Jegathammbal, G., Kathiresan, K., Pandian, S.K., 2007. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Lett Appl Microbiol* 45, 219–223.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02180.x>
- Raya, R.R., H'bert, E.M., 2009. Isolation of Phage via Induction of Lysogens. *Methods Mol Biol* 501, 23–32. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_3
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M.T., McCormick, J.K., 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 16, 658–672.
<https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.658-672.2003>
- Remuzgo-Martínez, S., Lázaro-Díez, M., Mayer, C., Aranzamendi-Zaldumbide, M., Padilla, D., Calvo, J., Marco, F., Martínez-Martínez, L., Icardo, J.M., Otero, A., Ramos-Vivas, J., 2015. Biofilm Formation and Quorum-Sensing-Molecule Production by Clinical Isolates of *Serratia liquefaciens*. *Appl Environ Microbiol* 81, 3306–3315. <https://doi.org/10.1128/AEM.00088-15>
- Remuzgo-Martínez, S., Lázaro-Díez, M., Padilla, D., Vega, B., El Aamri, F., Icardo, J.M., Acosta, F., Ramos-Vivas, J., 2014. New aspects in the biology of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: pili, motility and adherence to solid surfaces. *Vet Microbiol* 174, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.005>
- Reverter, M., Sarter, S., Caruso, D., Avarre, J.-C., Combe, M., Pepey, E., Pouyaud, L., Vega-Heredía, S., de Verdal, H., Gozlan, R.E., 2020. Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. *Nat Commun* 11, 1870. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15735-6>
- Rodríguez-Rubio, L., Gutiérrez, D., Donovan, D.M., Martínez, B., Rodríguez, A., García, P., 2016. Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical

- antimicrobials. *Crit Rev Biotechnol* 36, 542–552.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2014.993587>
- Rossi, C., Chaves-López, C., Serio, A., Casaccia, M., Maggio, F., Paparella, A., 2022. Effectiveness and mechanisms of essential oils for biofilm control on food-contact surfaces: An updated review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 62, 2172–2191.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1851169>
- Roux, S., Brum, J.R., Dutilh, B.E., Sunagawa, S., Duhaime, M.B., Loy, A., Poulos, B.T., Solonenko, N., Lara, E., Poulain, J., Pesant, S., Kandels-Lewis, S., Dimier, C., Picheral, M., Searson, S., Cruaud, C., Alberti, A., Duarte, C.M., Gasol, J.M., Vaqué, D., Tara Oceans Coordinators, Bork, P., Acinas, S.G., Wincker, P., Sullivan, M.B., 2016. Ecogenomics and potential biogeochemical impacts of globally abundant ocean viruses. *Nature* 537, 689–693.
<https://doi.org/10.1038/nature19366>
- Ruiz, C.H., Osorio-Llanes, E., Trespalacios, M.H., Mendoza-Torres, E., Rosales, W., Gómez, C.M.M., 2022. Quorum Sensing Regulation as a Target for Antimicrobial Therapy. *Mini Rev Med Chem* 22, 848–864.
<https://doi.org/10.2174/1389557521666211202115259>
- Runtuvuori-Salmela, A., Kunttu, H.M.T., Laanto, E., Almeida, G.M.F., Mäkelä, K., Middelboe, M., Sundberg, L.-R., 2022. Prevalence of genetically similar *Flavobacterium columnare* phages across aquaculture environments reveals a strong potential for pathogen control. *Environ Microbiol* 24, 2404–2420.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15901>
- Salminen, S.J., Gueimonde, M., Isolauri, E., 2005. Probiotics that modify disease risk. *J Nutr* 135, 1294–1298. <https://doi.org/10.1093/jn/135.5.1294>
- Samot, J., Lebreton, J., Badet, C., 2011. Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes. *Anaerobe* 17, 69–72.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.04.001>
- Santajit, S., Sookrung, N., Indrawattana, N., 2022. Quorum Sensing in ESKAPE Bugs: A Target for Combating Antimicrobial Resistance and Bacterial Virulence. *Biology (Basel)* 11, 1466. <https://doi.org/10.3390/biology11101466>
- Saxelin, M., 2008. Probiotic formulations and applications, the current probiotics market, and changes in the marketplace: a European perspective. *Clin Infect Dis* 46 Suppl 2, S76-79; discussion S144-151. <https://doi.org/10.1086/523337>

- Schar, D., Klein, E.Y., Laxminarayan, R., Gilbert, M., Van Boeckel, T.P., 2020. Global trends in antimicrobial use in aquaculture. *Sci Rep* 10, 21878. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78849-3>
- Schar, D., Zhao, C., Wang, Y., Larsson, D.G.J., Gilbert, M., Van Boeckel, T.P., 2021. Twenty-year trends in antimicrobial resistance from aquaculture and fisheries in Asia. *Nat Commun* 12, 5384. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25655-8>
- Semenyuk, P.I., Moiseenko, A.V., Sokolova, O.S., Muronetz, V.I., Kurochkina, L.P., 2020. Structural and functional diversity of novel and known bacteriophage-encoded chaperonins. *Int J Biol Macromol* 157, 544–552. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.189>
- Shan, T., Yang, S., Wang, Haoning, Wang, Hao, Zhang, Ju, Gong, G., Xiao, Y., Yang, J., Wang, Xiaolong, Lu, J., Zhao, M., Yang, Z., Lu, X., Dai, Z., He, Y., Chen, X., Zhou, R., Yao, Y., Kong, N., Zeng, J., Ullah, K., Wang, Xiaochun, Shen, Q., Deng, X., Zhang, Jianmin, Delwart, E., Tong, G., Zhang, W., 2022. Virome in the cloaca of wild and breeding birds revealed a diversity of significant viruses. *Microbiome* 10, 60. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01246-7>
- Shao, Y., Wang, I.-N., 2008. Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. *Genetics* 180, 471–482. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.090100>
- Sharifi, A., Nayeri Fasaei, B., 2022. Selected plant essential oils inhibit biofilm formation and luxS- and pfs-mediated quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 74, 916–923. <https://doi.org/10.1111/lam.13673>
- Sharma, U., Vipra, A., Channabasappa, S., 2018. Phage-derived lysins as potential agents for eradicating biofilms and persisters. *Drug Discov Today* 23, 848–856. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.026>
- Shivu, M.M., Rajeeva, B.C., Girisha, S.K., Karunasagar, Indrani, Krohne, G., Karunasagar, Iddya, 2007. Molecular characterization of *Vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India. *Environ Microbiol* 9, 322–331. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01140.x>
- Shkoporov, A.N., Hill, C., 2019. Bacteriophages of the Human Gut: The “Known Unknown” of the Microbiome. *Cell Host Microbe* 25, 195–209. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.017>

- Sikdar, R., Elias, M., 2020. Quorum quenching enzymes and their effects on virulence, biofilm, and microbiomes: a review of recent advances. *Expert Rev Anti Infect Ther* 18, 1221–1233. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1794815>
- Silva, Y.J., Costa, L., Pereira, C., Mateus, C., Cunha, A., Calado, R., Gomes, N.C.M., Pardo, M.A., Hernandez, I., Almeida, A., 2014. Phage therapy as an approach to prevent *Vibrio anguillarum* infections in fish larvae production. *PLoS One* 9, e114197. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114197>
- Silva, Y.J., Moreirinha, C., Pereira, C., Costa, L., Rocha, R.J.M., Cunha, Â., Gomes, N.C.M., Calado, R., Almeida, A., 2016. Biological control of *Aeromonas salmonicida* infection in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with Phage AS-A. *Aquaculture* 450, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.025>
- Simanek, K.A., Paczkowski, J.E., 2022. Resistance Is Not Futile: The Role of Quorum Sensing Plasticity in *Pseudomonas aeruginosa* Infections and Its Link to Intrinsic Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microorganisms* 10, 1247. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061247>
- Simmonds, P., Adams, M.J., Benkő, M., Breitbart, M., Brister, J.R., Carstens, E.B., Davison, A.J., Delwart, E., Gorbalenya, A.E., Harrach, B., Hull, R., King, A.M.Q., Koonin, E.V., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Lefkowitz, E.J., Nibert, M.L., Orton, R., Roossinck, M.J., Sabanadzovic, S., Sullivan, M.B., Suttle, C.A., Tesh, R.B., van der Vlugt, R.A., Varsani, A., Zerbini, F.M., 2017. Consensus statement: Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nat Rev Microbiol* 15, 161–168. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.177>
- Sonnenschein, E.C., Jimenez, G., Castex, M., Gram, L., 2021. The Roseobacter-Group Bacterium *Phaeobacter* as a Safe Probiotic Solution for Aquaculture. *Appl Environ Microbiol* 87, e0258120. <https://doi.org/10.1128/AEM.02581-20>
- Srinivasan, P., Ramasamy, P., 2017. Morphological characterization and biocontrol effects of *Vibrio vulnificus* phages against Vibriosis in the shrimp aquaculture environment. *Microb Pathog* 111, 472–480. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.024>
- Srinivasan, R., Devi, K.R., Santhakumari, S., Kannappan, A., Chen, X., Ravi, A.V., Lin, X., 2020. Anti-quorum Sensing and Protective Efficacies of Naringin Against *Aeromonas hydrophila* Infection in *Danio rerio*. *Front Microbiol* 11, 600622. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.600622>

- Stalin, N., Srinivasan, P., 2017. Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. *Vet Microbiol* 207, 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.06.006>
- Stenholm, A.R., Dalsgaard, I., Middelboe, M., 2008. Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ Microbiol* 74, 4070–4078. <https://doi.org/10.1128/AEM.00428-08>
- Stentiford, G.D., Neil, D.M., Peeler, E.J., Shields, J.D., Small, H.J., Flegel, T.W., Vlak, J.M., Jones, B., Morado, F., Moss, S., Lotz, J., Bartholomay, L., Behringer, D.C., Hauton, C., Lightner, D.V., 2012. Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. *J Invertebr Pathol* 110, 141–157. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.013>
- Stevenson, R.M., Airdrie, D.W., 1984. Isolation of *Yersinia ruckeri* Bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* 47, 1201–1205. <https://doi.org/10.1128/aem.47.6.1201-1205.1984>
- Stevenson, T.J., Visser, M.E., Arnold, W., Barrett, P., Biello, S., Dawson, A., Denlinger, D.L., Dominoni, D., Ebling, F.J., Elton, S., Evans, N., Ferguson, H.M., Foster, R.G., Hau, M., Haydon, D.T., Hazlerigg, D.G., Heideman, P., Hopcraft, J.G.C., Jonsson, N.N., Kronfeld-Schor, N., Kumar, V., Lincoln, G.A., MacLeod, R., Martin, S. a. M., Martinez-Bakker, M., Nelson, R.J., Reed, T., Robinson, J.E., Rock, D., Schwartz, W.J., Steffan-Dewenter, I., Tauber, E., Thackeray, S.J., Umstatter, C., Yoshimura, T., Helm, B., 2015. Disrupted seasonal biology impacts health, food security and ecosystems. *Proc Biol Sci* 282, 20151453. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1453>
- Stincone, P., Brandelli, A., 2020. Marine bacteria as source of antimicrobial compounds. *Crit Rev Biotechnol* 40, 306–319. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1710457>
- Tan, D., Gram, L., Middelboe, M., 2014. Vibriophages and their interactions with the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Appl Environ Microbiol* 80, 3128–3140. <https://doi.org/10.1128/AEM.03544-13>
- Tanaka, Y., Nishikawa, M., Kamisaki, K., Hachiya, S., Nakamura, M., Kuwazuru, T., Tanimura, S., Soyano, K., Takeda, K., 2022. Marine-derived microbes and molecules for drug discovery. *Inflamm Regen* 42, 18. <https://doi.org/10.1186/s41232-022-00207-9>

- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M.A., Prabhakar, A., Shalla, A.H., Rather, M.A., 2019. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microb Pathog* 134, 103580. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
- Thanki, A.M., Taylor-Joyce, G., Dowah, A., Nale, J.Y., Malik, D., Clokie, M.R.J., 2018. Unravelling the Links between Phage Adsorption and Successful Infection in *Clostridium difficile*. *Viruses* 10, 411. <https://doi.org/10.3390/v10080411>
- Trossman, S., 2014. The war on superbugs. Addressing the issue of antibiotic resistance. *Am Nurse* 46, 1, 8.
- Trudil, D., 2015. Phage lytic enzymes: a history. *Virol Sin* 30, 26–32. <https://doi.org/10.1007/s12250-014-3549-0>
- Tu, V.Q., Nguyen, T.-T., Tran, X.T.T., Millard, A.D., Phan, H.T., Le, N.P., Dang, O.T.H., Hoang, H.A., 2020. Complete genome sequence of a novel lytic phage infecting *Aeromonas hydrophila*, an infectious agent in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Arch Virol* 165, 2973–2977. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04793-2>
- Twort, F.W., 1936. Further Investigations on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses and their Cultivation. *J Hyg (Lond)* 36, 204–235. <https://doi.org/10.1017/s0022172400043606>
- Twort, F.W., 1915. AN INVESTIGATION ON THE NATURE OF ULTRA-MICROSCOPIC VIRUSES. *The Lancet* 186, 1241–1243. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)20383-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)20383-3)
- Ul Haq, I., Chaudhry, W.N., Andleeb, S., Qadri, I., 2012. Isolation and partial characterization of a virulent bacteriophage IHQ1 specific for *Aeromonas punctata* from stream water. *Microb Ecol* 63, 954–963. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9944-2>
- V Volozhantsev, N., M Shpirt, A., I Borzilov, A., V Komisarova, E., M Krasilnikova, V., S Shashkov, A., V Verevkin, V., A Knirel, Y., 2020. Characterization and Therapeutic Potential of Bacteriophage-Encoded Polysaccharide Depolymerases with β Galactosidase Activity against *Klebsiella pneumoniae* K57 Capsular Type. *Antibiotics (Basel)* 9, 732. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110732>
- Valente, R.S., Nadal-Jimenez, P., Carvalho, A.F.P., Vieira, F.J.D., Xavier, K.B., 2017. Signal Integration in Quorum Sensing Enables Cross-Species Induction of

- Virulence in *Pectobacterium wasabiae*. *mBio* 8, e00398-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00398-17>
- Vázquez, R., García, E., García, P., 2018. Phage Lysins for Fighting Bacterial Respiratory Infections: A New Generation of Antimicrobials. *Front Immunol* 9, 2252. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02252>
- Vergis, J., Rawool, D.B., Singh Malik, S.V., Barbuddhe, S.B., 2021. Food safety in fisheries: Application of One Health approach. *Indian J Med Res* 153, 348–357. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_573_21
- Vermassen, A., Leroy, S., Talon, R., Provot, C., Popowska, M., Desvaux, M., 2019. Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan. *Front Microbiol* 10, 331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00331>
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 655–671. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000>
- Veyrand-Quirós, B., Gómez-Gil, B., Lomeli-Ortega, C.O., Escobedo-Fregoso, C., Millard, A.D., Tovar-Ramírez, D., Balcázar, J.L., Quiroz-Guzmán, E., 2020. Use of bacteriophage vB_Pd_PDCC-1 as biological control agent of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* during hatching of longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) eggs. *J Appl Microbiol* 129, 1497–1510. <https://doi.org/10.1111/jam.14744>
- Vieira, R.H.S.D.F., Carvalho, E.M.R., Carvalho, F.C.T., Silva, C.M., Sousa, O.V., Rodrigues, D.P., 2010. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and pond environment in northeastern Brazil. *J Environ Sci Health B* 45, 198–203. <https://doi.org/10.1080/03601231003613526>
- Vila, J., Moreno-Morales, J., Ballesté-Delpierre, C., 2020. Current landscape in the discovery of novel antibacterial agents. *Clin Microbiol Infect* 26, 596–603. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.09.015>
- Vincent, A.T., Paquet, V.E., Bernatchez, A., Tremblay, D.M., Moineau, S., Charette, S.J., 2017. Characterization and diversity of phages infecting *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Sci Rep* 7, 7054. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07401-7>

- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol Rev* 30, 404–427. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00017.x>
- Vinod, M.G., Shivu, M.M., Umesha, K.R., Rajeeva, B.C., Krohne, G., Karunasagar, Indrani, Karunasagar, Iddya, 2006. Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture* 255, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.12.003>
- Vivas, J., Razquin, B.E., López-Fierro, P., Naharro, G., Villena, A., 2004. Correlation between production of acyl homoserine lactones and proteases in an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine. *Vet Microbiol* 101, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.04.003>
- Vivas, Jose, Riaño, J., Carracedo, B., Razquin, B.E., López-Fierro, P., Naharro, G., Villena, A.J., 2004. The auxotrophic aroA mutant of *Aeromonas hydrophila* as a live attenuated vaccine against *A. salmonicida* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 16, 193–206. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(03\)00078-0](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(03)00078-0)
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., Foster, S., 2008. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* 32, 259–286. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x>
- Waksman, S.A., 1947. What is an antibiotic or an antibiotic substance? *Mycologia* 39, 565–569.
- Walakira, J.K., Carrias, A.A., Hossain, M.J., Jones, E., Terhune, J.S., Liles, M.R., 2008. Identification and characterization of bacteriophages specific to the catfish pathogen, *Edwardsiella ictaluri*. *J Appl Microbiol* 105, 2133–2142. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03933.x>
- Wang, G., Chen, Y., Xia, Y., Song, X., Ai, L., 2022. Characteristics of Probiotic Preparations and Their Applications. *Foods* 11, 2472. <https://doi.org/10.3390/foods11162472>
- Wang, J.-B., Lin, N.-T., Tseng, Y.-H., Weng, S.-F., 2016. Genomic Characterization of the Novel *Aeromonas hydrophila* Phage Ahp1 Suggests the Derivation of a New Subgroup from phiKMV-Like Family. *PLoS One* 11, e0162060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162060>
- Wang, J.-B., Yu, M.-S., Tseng, T.-T., Lin, L.-C., 2021. Molecular Characterization of Ahp2, a Lytic Bacteriophage of *Aeromonas hydrophila*. *Viruses* 13, 477. <https://doi.org/10.3390/v13030477>

- Wang, W., Ma, H., Zhu, Y., Ni, K., Qin, G., Tan, Z., Wang, Y., Wang, L., Pang, H., 2021. Screening of Lactic Acid Bacteria with Inhibitory Activity against ETEC K88 as Feed Additive and the Effects on Sows and Piglets. *Animals (Basel)* 11, 1719. <https://doi.org/10.3390/ani11061719>
- Wang, Y., Barton, M., Elliott, L., Li, X., Abraham, S., O'Dea, M., Munro, J., 2017. Bacteriophage therapy for the control of *Vibrio harveyi* in greenlip abalone (*Haliotis laevis*). *Aquaculture* 473, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.003>
- Wang, Z., Kong, L., Liu, Y., Fu, Q., Cui, Z., Wang, J., Ma, J., Wang, H., Yan, Y., Sun, J., 2018. A Phage Lysin Fused to a Cell-Penetrating Peptide Kills Intracellular Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Keratinocytes and Has Potential as a Treatment for Skin Infections in Mice. *Appl Environ Microbiol* 84, e00380-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00380-18>
- Waseem, H., Williams, M.R., Jameel, S., Hashsham, S.A., 2018. Antimicrobial Resistance in the Environment. *Water Environ Res* 90, 865–884. <https://doi.org/10.2175/106143018X15289915807056>
- Washizaki, A., Yonesaki, T., Otsuka, Y., 2016. Characterization of the interactions between *Escherichia coli* receptors, LPS and OmpC, and bacteriophage T4 long tail fibers. *Microbiologyopen* 5, 1003–1015. <https://doi.org/10.1002/mbo3.384>
- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 319–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
- Welch, T.J., 2020. Characterization of a novel *Yersinia ruckeri* serotype O1-specific bacteriophage with virulence-neutralizing activity. *J Fish Dis* 43, 285–293. <https://doi.org/10.1111/jfd.13124>
- Wigington, C.H., Sonderegger, D., Brussaard, C.P.D., Buchan, A., Finke, J.F., Fuhrman, J.A., Lennon, J.T., Middelboe, M., Suttle, C.A., Stock, C., Wilson, W.H., Wommack, K.E., Wilhelm, S.W., Weitz, J.S., 2016. Re-examination of the relationship between marine virus and microbial cell abundances. *Nat Microbiol* 1, 15024. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.24>
- Williamson, S.J., Houchin, L.A., McDaniel, L., Paul, J.H., 2002. Seasonal variation in lysogeny as depicted by prophage induction in Tampa Bay, Florida. *Appl Environ Microbiol* 68, 4307–4314. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4307-4314.2002>

- Winter, C., Smit, A., Herndl, G.J., Weinbauer, M.G., 2004. Impact of viroplankton on archaeal and bacterial community richness as assessed in seawater batch cultures. *Appl Environ Microbiol* 70, 804–813. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.804-813.2004>
- Wommack, K.E., Nasko, D.J., Chopyk, J., Sakowski, E.G., 2015. Counts and sequences, observations that continue to change our understanding of viruses in nature. *J Microbiol* 53, 181–192. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-5068-6>
- Woodward, G., Perkins, D.M., Brown, L.E., 2010. Climate change and freshwater ecosystems: impacts across multiple levels of organization. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365, 2093–2106. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0055>
- Wright, E.E., Elliman, J.R., Owens, L., 2013. Induction and characterization of lysogenic bacteriophages from *Streptococcus iniae*. *J Appl Microbiol* 114, 1616–1624. <https://doi.org/10.1111/jam.12192>
- Wu, B., Huang, L., Chen, J., Zhang, Y., Wang, J., He, J., 2021. Gut microbiota of homologous Chinese soft-shell turtles (*Pelodiscus sinensis*) in different habitats. *BMC Microbiol* 21, 142. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02209-y>
- Xiong, Z.-Q., Wang, J.-F., Hao, Y.-Y., Wang, Y., 2013. Recent advances in the discovery and development of marine microbial natural products. *Mar Drugs* 11, 700–717. <https://doi.org/10.3390/md11030700>
- Xu, Z., Jin, P., Zhou, X., Zhang, Y., Wang, Q., Liu, X., Shao, S., Liu, Q., 2021. Isolation of a Virulent *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida* Bacteriophage and Its Application in Phage Therapy in Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Appl Environ Microbiol* 87, e0146821. <https://doi.org/10.1128/AEM.01468-21>
- Yamaki, S., Kawai, Y., Yamazaki, K., 2015. Characterization of a novel bacteriophage, Phda1, infecting the histamine-producing *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *J Appl Microbiol* 118, 1541–1550. <https://doi.org/10.1111/jam.12809>
- Yan, G., Liu, J., Ma, Q., Zhu, R., Guo, Z., Gao, C., Wang, S., Yu, L., Gu, J., Hu, D., Han, W., Du, R., Yang, J., Lei, L., 2017. The N-terminal and central domain of colicin A enables phage lysin to lyse *Escherichia coli* extracellularly. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110, 1627–1635. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0912-9>
- Yan, J., Li, P., Wang, X., Zhu, M., Shi, H., Yu, G., Chen, X., Wang, H., Zhou, X., Liao, L., Zhang, L., 2022. RasI/R Quorum Sensing System Controls the Virulence of *Ralstonia solanacearum* Strain EP1. *Appl Environ Microbiol* 88, e0032522. <https://doi.org/10.1128/aem.00325-22>

- Yang, M., Liang, Y., Huang, S., Zhang, J., Wang, J., Chen, H., Ye, Y., Gao, X., Wu, Q., Tan, Z., 2020. Isolation and Characterization of the Novel Phages vB_VpS_BA3 and vB_VpS_CA8 for Lysing *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Microbiol* 11, 259. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00259>
- Yang, Z., Yuan, S., Chen, L., Liu, Q., Zhang, H., Ma, Y., Wei, T., Huang, S., 2018. Complete genome analysis of bacteriophage AsXd-1, a new member of the genus Hk97virus, family Siphoviridae. *Arch Virol* 163, 3195–3197. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3977-5>
- Yang, Z.-Q., Tao, X.-Y., Zhang, H., Rao, S.-Q., Gao, L., Pan, Z.-M., Jiao, X.-A., 2019. Isolation and characterization of virulent phages infecting *Shewanella baltica* and *Shewanella putrefaciens*, and their application for biopreservation of chilled channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Int J Food Microbiol* 292, 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.020>
- Yasin, I.M., Razak, N.F., Natrah, F.M.I., Harmin, S.A., 2016. Selection and evaluation of Malaysian *Bacillus* spp. strains as potential probiotics in cultured tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*). *J Environ Biol* 37, 791–800.
- Yasuike, M., Kai, W., Nakamura, Y., Fujiwara, A., Kawato, Y., Hassan, E.S., Mahmoud, M.M., Nagai, S., Kobayashi, T., Ototake, M., Nakai, T., 2014. Complete Genome Sequence of the *Edwardsiella ictaluri*-Specific Bacteriophage PEi21, Isolated from River Water in Japan. *Genome Announc* 2, e00228-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00228-14>
- Yasuike, M., Nishiki, I., Iwasaki, Y., Nakamura, Y., Fujiwara, A., Sugaya, E., Kawato, Y., Nagai, S., Kobayashi, T., Ototake, M., Nakai, T., 2015. Full-genome sequence of a novel myovirus, GF-2, infecting *Edwardsiella tarda*: comparison with other *Edwardsiella* myoviral genomes. *Arch Virol* 160, 2129–2133. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2472-5>
- You, H.J., Lee, J.H., Oh, M., Hong, S.Y., Kim, D., Noh, J., Kim, M., Kim, B.S., 2021. Tackling *Vibrio parahaemolyticus* in ready-to-eat raw fish flesh slices using lytic phage VPT02 isolated from market oyster. *Food Res Int* 150, 110779. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110779>
- Young, I., Wang, I., Roof, W.D., 2000. Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol* 8, 120–128. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01705-4](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01705-4)
- Young, R., 1992. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol Rev* 56, 430–481. <https://doi.org/10.1128/mr.56.3.430-481.1992>

- Yu, W.-T., Jong, K.-J., Lin, Y.-R., Tsai, S., Tey, Y.H., Wong, H., 2013. Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster and clam culturing environments in Taiwan. *Int J Food Microbiol* 160, 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.002>
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F.M., Larsen, M.V., 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 67, 2640–2644. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>
- Zeigler Allen, L., McCrow, J.P., Ininbergs, K., Dupont, C.L., Badger, J.H., Hoffman, J.M., Ekman, M., Allen, A.E., Bergman, B., Venter, J.C., 2017. The Baltic Sea Virome: Diversity and Transcriptional Activity of DNA and RNA Viruses. *mSystems* 2, e00125-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00125-16>
- Zhang, D., Gan, R.-Y., Zhang, J.-R., Farha, A.K., Li, H.-B., Zhu, F., Wang, X.-H., Corke, H., 2020. Antivirulence properties and related mechanisms of spice essential oils: A comprehensive review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 19, 1018–1055. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12549>
- Zhang, R., Li, Y., Yan, W., Wang, Y., Cai, L., Luo, T., Li, H., Weinbauer, M.G., Jiao, N., 2020. Viral control of biomass and diversity of bacterioplankton in the deep sea. *Commun Biol* 3, 256. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0974-5>
- Zhang, S., Liu, N., Liang, W., Han, Q., Zhang, W., Li, C., 2017. Quorum sensing-disrupting coumarin suppressing virulence phenotypes in *Vibrio splendidus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101, 3371–3378. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8009-3>
- Zhang, Y., Li, J., Hu, Z., Chen, D., Li, F., Huang, X., Li, C., 2022. Transcriptome Analysis Reveals the Algicidal Mechanism of *Brevibacillus laterosporus* against *Microcystis aeruginosa* through Multiple Metabolic Pathways. *Toxins (Basel)* 14, 492. <https://doi.org/10.3390/toxins14070492>
- Zhang, Y.L., Ong, C.T., Leung, K.Y., 2000. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbiology (Reading)* 146 (Pt 4), 999–1009. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-4-999>
- Zhao, J., Chen, M., Quan, C.S., Fan, S.D., 2015. Mechanisms of quorum sensing and strategies for quorum sensing disruption in aquaculture pathogens. *J Fish Dis* 38, 771–786. <https://doi.org/10.1111/jfd.12299>

- Zheng, D., Yin, G., Liu, M., Chen, C., Jiang, Y., Hou, L., Zheng, Y., 2021. A systematic review of antibiotics and antibiotic resistance genes in estuarine and coastal environments. *Sci Total Environ* 777, 146009. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146009>
- Zhou, A., Xie, S., Sun, D., Zhang, P., Dong, H., Zuo, Z., Li, X., Zou, J., 2020. A First Insight into the Structural and Functional Comparison of Environmental Microbiota in Freshwater Turtle *Chinemys reevesii* at Different Growth Stages under Pond and Greenhouse Cultivation. *Microorganisms* 8, 1277. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091277>
- Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K.H., Dennis, J.J., Wishart, D.S., 2011. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res* 39, W347-352. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr485>

Anexos

En los Anexos I-VIII se depositan los archivos FASTA con las secuencias de los genomas de las cepas seleccionadas y secuenciadas. Se proporciona un pendrive al tribunal.