



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Instituto Universitario de Sanidad Animal
y Seguridad Alimentaria

D^a MARÍA SORAYA DÉNIZ SUÁREZ, SECRETARIA DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA

Que el consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha de junio de 2012 tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada: **“PROPUESTA DE NUEVAS CEPAS PROBIÓTICAS PARA USO EN ACUICULTURA”**, presentada por la doctoranda Dña. Lita Sorroza Ochoa, dirigida por el Catedrático D. Fernando Real Valcárcel y por el Doctor D. Daniel Padilla Castillo.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 20 de mayo de dos mil doce.

Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD
ALIMENTARIA**

Título de la Tesis

**“PROPUESTA DE NUEVAS CEPAS PROBIÓTICAS PARA
USO EN ACUICULTURA”**

Tesis Doctoral presentada por Dña. Lita Sorroza Ochoa

Dirigida por el Catedrático D. Fernando Real Valcárcel y el Dr. D. Daniel Padilla Castillo

El Director

El Director

Fernando Real Valcárcel

Daniel Padilla Castillo

La Doctoranda

Lita Sorroza Ochoa

Arucas, a 28 de mayo de 2012

D. FERNANDO REAL VALCÁRCEL, CATEDRÁTICO DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA.

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral titulada “**PROPUESTA DE NUEVAS CEPAS PROBIÓTICAS PARA USO EN ACUICULTURA**” realizada por Dña. Lita Sorroza Ochoa, Licenciada en Ciencias del Mar, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha sido realizada bajo mi dirección y considerando que reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctora, autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo la presente en Arucas, a 28 de mayo de 2012.

Fdo. Fernando Real Valcárcel

D. DANIEL PADILLA CASTILLO, PROFESOR ASOCIADO DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA.

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral titulada “**PROPUESTA DE NUEVAS CEPAS PROBIÓTICAS PARA USO EN ACUICULTURA**” realizada por Dña. Lita Sorroza Ochoa, Licenciada en Ciencias del Mar, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha sido realizada bajo mi dirección y considerando que reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctora, autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

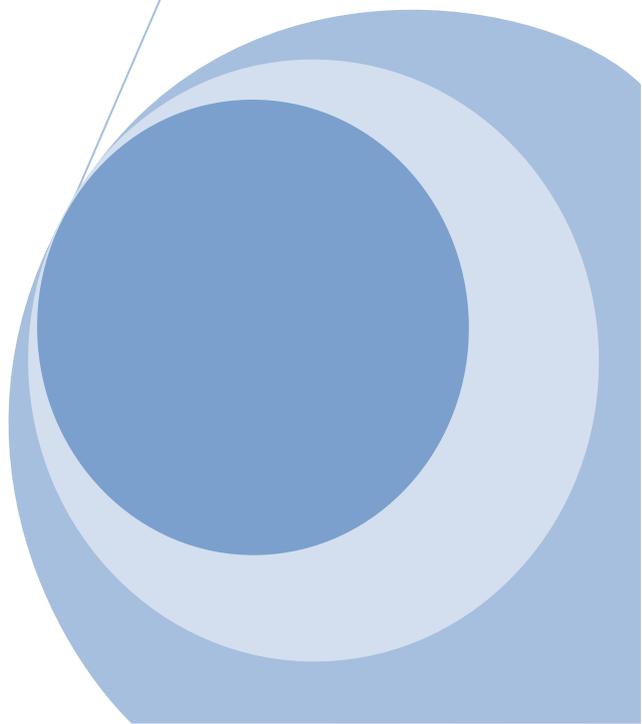
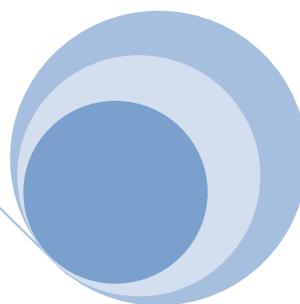
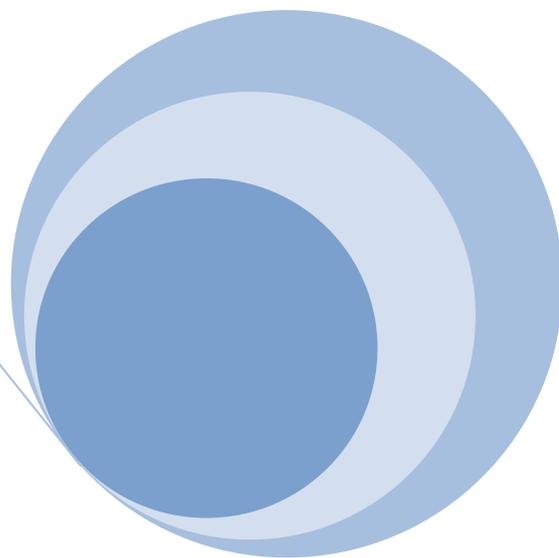
Y para que así conste, firmo la presente en Arucas, a 28 de mayo de 2012.

Fdo. Daniel Padilla Castillo

A mi madre y hermanos, Penélope, Elmer y Segundo

por todo el amor brindado en el transcurso de mi vida

ÍNDICE

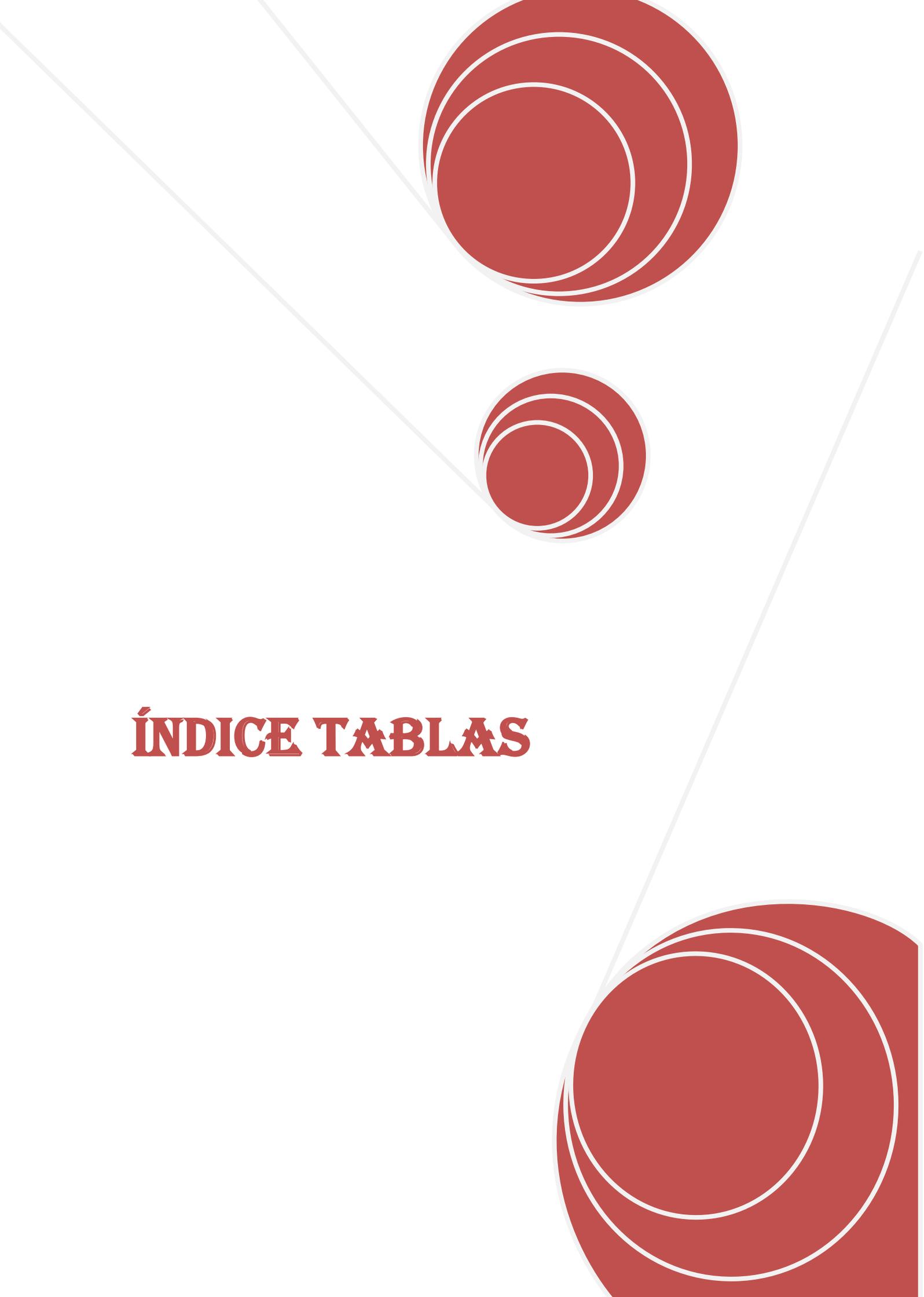


ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ABREVIATURAS EMPLEADAS	VI
I.-INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
II.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
II.1.- Importancia de la Acuicultura	4
II.1.1.- La acuicultura en el mundo	4
II.1.2.- La acuicultura en la Unión Europea	6
II.1.3.- La acuicultura en España	7
II.1.4.- La acuicultura en las Islas Canarias	8
II.2.- Las enfermedades en piscicultura marina	9
II.2.1.- Enfermedades parasitarias	9
II.2.1.1.- <i>Cryptocaryon irritans</i>	10
II.2.1.2.- <i>Amyloodinium ocellatum</i>	10
II.2.1.3.- <i>Furnestinia echeneis</i> y <i>Sparycotyle chrysophrii</i>	10
II.2.1.4.- <i>Enteromyxum leei</i>	11
II.2.2.- Enfermedades víricas	11
II.2.2.1.-Encefalopatía y retinopatía viral	11
II.2.2.2.-Linfocistis	11
II.2.3.- Enfermedades bacterianas	12
II.2.3.1.-Pasteurelosis	12
II.2.3.2.-Vibriosis	13
II.2.3.3.-Flexibacteriosis	13
II.2.3.4.-Estreptococosis	14
II.3.- Vibriosis en Acuicultura	14
II.3.1.-Etiología	14
II.3.2.-Epidemiología y Patogenia	16
II.3.3.- Clínica y Lesiones	17
II.3.4.- Diagnóstico	18
II.3.5.-Métodos de prevención	18

II.3.6.- Tratamiento	19
II.4.- Antibióticos en Acuicultura	19
II.5.- Vacunas en Acuicultura	21
II.6.- Inmunoestimulantes en Acuicultura	23
II.7.- Probióticos en Acuicultura	25
II.7.1.- Bacterias ácido lácticas	27
II.7.2.- Funciones de la microbiota natural en los organismos vivos	28
II.7.3.- Criterios de selección de una cepa probiótica	29
II.7.4.- Mecanismos de acción de los probióticos	30
II.7.4.1.- Producción de compuestos inhibidores	30
II.7.4.2.- Competición por energía disponible o por compuestos químicos	33
II.7.4.3.- Competición por lugares de fijación	34
II.7.4.4.- Aumento de la respuesta inmune	35
II.7.4.5.- Mejora de la calidad del agua	37
II.7.4.6.- Contribución enzimática para la digestión	37
II.7.4.7.- Fuente de macro-micro nutrientes	38
II.7.5.- Los probióticos como preventivo de enfermedades en acuicultura	39
III.-MATERIAL Y MÉTODOS	48
III.1.- Aislamiento de cepas probióticas	48
III.2.- Selección de cepas probióticas	49
III.2.1.-Mecanismos de acción <i>in vitro</i>	49
III.2.1.1.- Inhibición del crecimiento de patógenos de interés en piscicultura	49
III.2.1.2.- Producción de sustancias antibacterianas	50
III.2.1.2.1.- Determinación de ácidos orgánicos	52
III.2.1.3.- Competición por nutrientes	53
III.2.1.4.- Resistencia a gradientes de pH y bilis	54
III.2.1.5.- Hidrofobicidad celular	55
III.2.1.6.- Adhesión de las bacterias al mucus intestinal	55
III.2.1.7.- Ensayo de exclusión competitiva	59
III.2.1.8.- Crecimiento de las cepas en el mucus intestinal	59
III.2.2.- Identificación de las cepas probióticas	60

III.2.3.- Otras características de las cepas probióticas seleccionadas	61
III.2.4.- Ensayo <i>in vivo</i>	64
III.2.4.1.- Determinación de la inocuidad de las cepas	64
III.2.4.2.- Incorporación del probiótico en la dieta experimental	65
III.2.4.3.- Colonización	66
III.2.4.4.- Efecto protector frente a una infección experimental con <i>Vibrio anguillarum</i>	66
III.3.- Análisis estadístico	69
IV.-RESULTADOS	70
IV.1.- Cepas probióticas obtenidas	70
IV.2.- Resultados de las pruebas <i>in vitro</i> de las cepas probióticas preseleccionadas	70
IV.2.1.- Producción de efecto inhibitorio del crecimiento frente a patógenos	70
IV.2.2.- Identificación de las cepas probióticas preseleccionadas	73
IV.2.3.- Producción de sustancias antibacterianas	77
IV.2.3.1.- Determinación de compuestos orgánicos en los sobrenadantes bacterianos utilizados	78
IV.2.4.- Competición por nutrientes	79
IV.2.5.- Resistencia a la bilis	80
IV.2.6.- Resistencia a gradientes de pH	82
IV.2.7.- Hidrofobicidad de la superficie celular	83
IV.2.8.- Adhesión al mucus intestinal	83
IV.2.9.- Exclusión competitiva	87
IV.2.10.- Crecimiento en mucus intestinal	89
IV.3.-Otras características de las cepas probióticas preseleccionadas	90
IV.3.1.- Patrón de sensibilidad antibiótica	91
IV.3.2.- Perfil de ácidos grasos	92
IV.4.- Ensayos <i>in vivo</i>	94
IV.4.1.- Inocuidad de las cepas probióticas preseleccionadas	94
IV.4.2.- Efecto protector del probiótico frente a una infección con <i>Vibrio anguillarum</i>	95
V.-DISCUSIÓN	99
V.1.- Nuevas cepas probióticas para la piscicultura marina	100

V.2.- Métodos alternativos para describir una característica de un probiótico	118
V.3.-Esquema de valoración del efecto de un probiótico, o de las sustancias producidas por el mismo	120
VI.- CONCLUSIONES	122
VII.- RESUMEN	123
VIII.- SUMMARY	124
IX.- BIBLIOGRAFIA	125
X.- ANEXOS	168
Anexo I.- Medios de cultivo	168
Anexo II.- Otros medios y soluciones empleadas	173
Anexo III.- Casas comerciales	176
XI.- PUBLICACIONES DE LA TESIS EN REVISTAS JCR	177
XII.- AGRADECIMIENTOS	182



ÍNDICE TABLAS

Tabla I.- Principales países productores de productos acuícolas, por toneladas anuales y tasa de variación interanual	5
Tabla II.- Principales especies producidas en acuicultura en 2008	6
Tabla III.- Características bioquímicas para la identificación de <i>Vibrio anguillarum</i> , según la galería API 20E (BioMérieux)	15
Tabla IV.- Límites máximos de residuos (LMR) de antibióticos y quimioterapéuticos para la acuicultura en la Unión Europea	21
Tabla V.- Inmunoestimulantes estudiados en peces	25
Tabla VI.- Probióticos utilizados en peces	43
Tabla VII.- Probióticos utilizados en moluscos y equinodermos	45
Tabla VIII.- Probióticos utilizados en crustáceos	46
Tabla IX.- Probióticos utilizados en alimento vivo	47
Tabla X.- Patógenos para la acuicultura, utilizados en la experiencia de inhibición del crecimiento de las cepas probióticas preseleccionadas	50
Tabla XI.- Inhibición del crecimiento frente a diferentes patógenos para la acuicultura realizada con las 12 cepas pre-seleccionadas como posibles probióticas	71
Tabla XII.- Resultados de las pruebas convencionales y galerías API 20 Strep (BioMérieux) realizadas para la identificación de las cepas probióticas pre-seleccionadas	73
Tabla XIII.- Resultado del metabolismo de carbohidratos de las cepas preseleccionadas mediante el sistema miniaturizado Api 50 CH (BioMérieux)	75
Tabla XIV.- Identificación molecular de las 4 cepas pre-seleccionadas como probióticas, mediante secuenciación parcial del gen 16S rRNA	77

Tabla XV.- Análisis por HPLC de los productos extracelulares de las cuatro cepas probióticas preseleccionadas con efecto antibacteriano (expresado como porcentaje de extracción)	78
Tabla XVI.- Efecto de cada cepa probiótica sobre el crecimiento de <i>Vibrio anguillarum</i> 975-1 y <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> 94/99 en co-cultivo	80
Tabla XVII.- Porcentaje de supervivencia ($\bar{X} \pm s$) de las cuatro cepas probióticas seleccionadas en bilis de diferentes especies de peces	81
Tabla XVIII.- Porcentajes medios de supervivencia ($\bar{X} \pm s$), de las cuatro cepas probióticas seleccionadas en diferentes valores de pH (3-7)	82
Tabla XIX.- Hidrofobicidad de las 4 cepas probióticas preseleccionadas	83
Tabla XX.- Porcentaje de adhesión ($\bar{X} \pm s$) de las cuatro cepas preseleccionadas a distintos sustratos, por el método de radioactividad	85
Tabla XXI.- Porcentaje de adhesión ($\bar{X} \pm s$) de las cuatro cepas a diferentes sustratos, por el método de fluorescencia	86
Tabla XXII.- Porcentaje de exclusión de <i>Vibrio anguillarum</i> 975-1 por la acción de las diferentes cepas probióticas estudiadas, mediante los métodos de radioactividad y fluorescencia	88
Tabla XXIII.- Porcentaje de exclusión de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> 94/99 por la acción de las diferentes cepas probióticas estudiadas, mediante los métodos de radioactividad y fluorescencia	89
Tabla XXIV.- Crecimiento de las 4 cepas probióticas en mucus intestinal de dorada, lubina, corvina y lenguado (expresado en ufc/ml)	90
Tabla XXV.- Resultados de la actividad enzimática de las diferentes cepas bacterianas preseleccionadas como probiótico con el sistema API Zym (BioMérieux)	91
Tabla XXVI.- Perfil de sensibilidad/resistencia antibiótica de las 4 cepas pre-seleccionadas como cepas probióticas	92

Tabla XXVII.- Perfil de ácidos grasos de las 4 cepas pre-seleccionadas como probiótico

93

ÍNDICE FIGURAS



Figura 1.- Inhibición del crecimiento de las cepas D3S1, L1 y L21 frente al patógeno <i>Vibrio anguillarum</i> 975-1	71
Figura 2.- Inhibición del crecimiento de las cepas D1, L1 y L21 frente al patógeno <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> 94/99	72
Figura 3.- Inhibición del crecimiento de las cepas D3S1, D1, L1 y L21 frente al patógeno <i>Yersinia ruckeri</i> 955	72
Figura 4.- Crecimiento y tinción de las 4 cepas preseleccionadas como probióticos, tras 24 horas de incubación	74
Figura 5.- Amplificación del ADN de las 4 cepas seleccionadas con los cebadores universales, antes de realizar la secuenciación	76
Figura 6.- Producción de sustancias antibacterianas en el pocillo sin neutralizar de la cepa L1 y L21 frente a <i>Vibrio anguillarum</i> , por el método de difusión en pocillo	77
Figura 7.- Producción de sideróforos en las 4 cepas preseleccionadas como cepas probióticas y de varias cepas de <i>V. anguillarum</i> utilizadas como control positivo	79
Figura 8.- Valores medios de supervivencia de las 4 cepas de probióticos en la bilis de las diferentes especies de peces estudiadas	81
Figura 9.- Viabilidad de las cuatro cepas probióticas estudiadas en una suspensión a pH entre 3 y 7	83
Figura 10.- Representación del porcentaje de adhesión a distintos sustratos de las 4 cepas probióticas estudiadas, mediante el método de radioactividad	85
Figura 11.- Representación del porcentaje de adhesión a distintos sustratos de las 4 cepas probióticas estudiadas, mediante el método de fluorescencia	86
Figura 12.- Dispersión de los porcentajes de adhesión de las 4 cepas probióticas estudiadas, mediante los métodos de radioactividad y de fluorescencia	87
Figura 13.- Porcentaje de exclusión de <i>Vibrio anguillarum</i> 975-1 por la acción de las diferentes cepas probióticas estudiadas, mediante radioactividad y fluorescencia	88
Figura 14.- Porcentaje de exclusión de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> 94/99 por la acción de las diferentes cepas probióticas estudiadas, mediante radioactividad y fluorescencia	89

Figura 15.- Cortes histológicos de diferentes órganos de peces inoculados con las cepas probióticas estudiadas (muestras correspondientes al lote inoculado con <i>E. gallinarum</i> L1)	94
Figura 16.- Opacidad corneal y hemorragia en lubinas infectadas con la cepa <i>V. anguillarum</i> 975-1	96
Figura 17.- Úlceras en la piel de lubinas infectadas con la cepa <i>V.anguillarum</i> 975-1	96
Figura 18.- Signos de septicemia hemorrágica en lubinas infectadas con la cepa <i>V. anguillarum</i> 975-1	96
Figura 19.- Identificación de <i>V. anguillarum</i> mediante el perfil Api 20 E (BioMérieux) (código de lectura 324752756)	97
Figura 20.- Confirmación de <i>V. anguillarum</i> 975-1 mediante PCR a partir de muestras de órganos internos de los peces infectados	97
Figura 21.- Porcentaje de supervivencia de lubinas previamente alimentadas con los probióticos <i>Vagococcus fluvialis</i> L21 y <i>Enterococcus gallinarum</i> L1, frente a la infección por <i>Vibrio anguillarum</i> 975-1	98
Figura 22.- Características que deben ser investigadas de un probiótico, según la forma de administración del mismo en los peces	121



ABREVIATURAS

AM	Agar Marino
AS	Agar sangre
ASB	Albumina Sérica bovina
APROMAR	Asociación Empresarial de Productos de Cultivos Marinos de España
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BAL	Bacteria ácido láctica
BHIA	Agar Infusión Cerebro Corazón
BHIB	Caldo Infusión Cerebro Corazón
BHT	Butil hidroxitolueno
CAS	Agar sulfato azul cromo
Ci mmol/ml	Milimoles de Curio por ml
C:M	Cloroformo Metanol
Col	Colaboradores
DO	Densidad óptica
DBA	Dolichos Biflorus Aglutinina
DPM	Degradaciones por minuto
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
g	Fuerza de la gravedad
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HDTMA	Hexadeciltrimetilamonio
Kpb	Kilopares de bases
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
mg	miligramos
MGC	Mucus Gástrico de Cerdo
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MRS	Agar Man Rogosa y Sharpe

Nm	Nanómetros
LMR	Límite Máximo de Residuos
LPS	Lipopolisacáridos
OIE	Organización Internacional de Epizootias
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SDS	Dodecilsulfato sódico
TCBS	Agar Tiosulfato Citrato sales Biliares Sacarosa
TAE	Tris base ácido etilendiaminotetraacético
TE	Tris clorhídrico etilendiaminotetraacético
TSA	Agar Trypticasa-Soja
TSB	Caldo Trypticasa-Soja
UV	Ultra violeta
ufc/ml	Unidades formadoras de colonia por mililitro
v/v	Volumen por volumen



I-INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

La acuicultura marina ha sido uno de los sectores de la producción animal que más rápidamente ha crecido en los últimos treinta años en todo el mundo. Los avances en las tecnologías aplicadas a la acuicultura han permitido un aumento en el volumen de producción, a través de la diversificación de sus actividades con nuevos sistemas de producción y con el cultivo de nuevas especies. Sin embargo, al igual que otros sectores en expansión, la acuicultura se enfrenta actualmente a nuevos retos, que hacen necesaria su reestructuración para lograr una mayor eficiencia y sustentabilidad.

El control de los costes de producción se ha convertido en un problema clave para la viabilidad económica de las piscifactorías marinas en el Mediterráneo. En los sistemas de cultivo intensivo y semi intensivos practicados en la región, un 10% de la población muere exclusivamente a causa de patógenos (Leong y Fryer, 1993). Las enfermedades se presentan debido a unas condiciones de cultivo desfavorables para la salud de los peces, y esto a menudo se presenta como un factor limitante que puede determinar la rentabilidad de las empresas.

Si bien la quimioterapia es quizás el método más rápido para prevenir y tratar las enfermedad infecciosas bacterianas, hoy en día, hay un creciente reconocimiento de sus limitaciones en la acuicultura, debido a que en algunos casos, más que proporcionar una solución, puede ocasionar efectos adversos en la salud del animal mediante la activación de la toxicidad, la resistencia, producción de residuos, etc, dando lugar a consecuencias ambientales muy serias, ya que los residuos del antibiótico pueden permanecer durante mucho tiempo en el medio acuático, y por ello ocasionar problemas en la salud pública (FAO, 2008).

Debido a los nuevos requisitos legales, a la demanda por parte de los consumidores de productos más seguros y de mayor calidad, así como por la preocupación por la conservación del medioambiente, se está reforzando la necesidad de aplicar un enfoque más integrador en el sector de la producción acuícola. Por esta razón, la Unión Europea ha planteado serias restricciones sobre el uso de antibióticos en acuicultura, sugiriendo la necesidad de utilizar métodos alternativos sostenibles con el medioambiente para la

prevención y control de enfermedades infecciosas en peces (Reglamento 1831/2003 del Consejo Europeo).

Sin duda, un diagnóstico rápido y preciso de las enfermedades junto a unos estudios epidemiológicos precisos, constituye la clave para minimizar el impacto de las enfermedades en piscicultura. La prevención es una de las mejores herramientas, y ésta se puede realizar mediante el uso de vacunas, inmunoestimulantes, o mediante el uso de microorganismos capaces de inhibir patógenos.

En el mercado existen vacunas comerciales para una gran variedad de enfermedades, pero en ocasiones su aplicación no siempre es viable ni efectiva. Por ello, hoy en día las investigaciones se centran en la búsqueda de métodos profilácticos alternativos, mediante la manipulación microbiana de las poblaciones en el medio ambiente de cultivo. En este sentido, el uso de probióticos ha despertado gran interés en las últimas décadas, debido a los enormes beneficios que juegan las bacterias no patógenas sobre la salud y bienestar de su hospedador, demostrando efectos positivos sobre el control de enfermedades, crecimiento, supervivencia, y sobre la producción en general (Kesarcodi-Watson y col., 2008).

Hasta la fecha se han ofrecido muchas definiciones sobre los probióticos, pero una de las más completas, en la que se incluye la importancia de la microbiota, es la propuesta por Verschuere y col. (2000a), donde definen a un probiótico como “*suplemento vivo microbiano que tiene efectos beneficiosos en el hospedador modificando la flora asociada al mismo y la flora asociada al ambiente*”. Más tarde, Reid y col. (2003) modifican esta definición incluyendo la frase “*cuando son administradas en cantidades adecuadas confieren un beneficio saludable para el hospedador*”.

Por esta razón, la finalidad de este trabajo es aislar y seleccionar cepas con características probióticas para ser utilizadas como medidas preventivas frente a infecciones bacterianas presentes en la acuicultura canaria. Sin embargo, a pesar conocer las enormes ventajas que presenta el uso de probióticos, es necesario obtener una mayor información sobre las cepas seleccionadas y la interacción hospedador/microorganismo para poder desarrollar verdaderas estrategias de control y prevención, y así, poder

garantizar la mejor utilización de estos microorganismos. Por todo ello, nos hemos planteado los siguientes objetivos.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar *in vitro* e *in vivo* las propiedades probióticas de cepas bacterianas aisladas y seleccionadas de diferentes especies de peces marinos de interés para la acuicultura mundial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar y aislar cepas bacterianas, obtenidas a partir de diferentes individuos sanos de especies de peces de interés para la acuicultura mundial, y que se cultivan en las mismas condiciones ambientales.

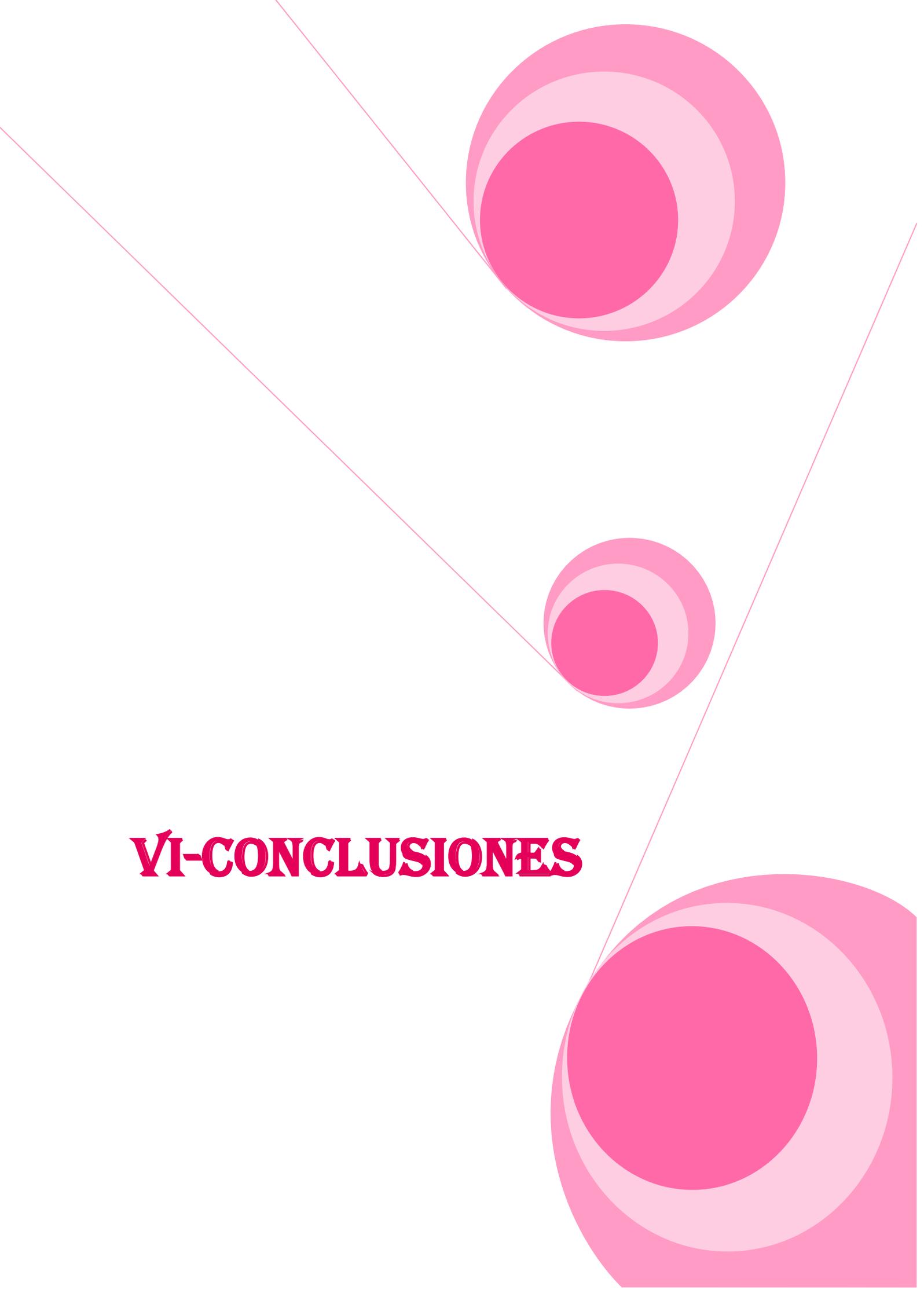
- Seleccionar y caracterizar cepas bacterianas que tengan capacidad probiótica, a partir de las mismas especies de peces marinos descritos en el objetivo anterior.

- Estudiar posibles métodos alternativos, cuando fuera posible, para la caracterización de cada una de las cepas seleccionadas.

- Identificar adecuadamente las cepas preseleccionadas como probióticas.

- Proponer las condiciones en las que deben ser utilizadas las cepas probióticas, respecto de la seguridad del medio ambiente.

- Evaluar el efecto protector y definir las condiciones de utilización, *in vivo*, de las cepas bacterianas seleccionadas, frente a una infección experimental con *Vibrio anguillarum* en lubina (*Dicentrarchus labrax*).

The image features a white background with three pink circles of varying sizes, each composed of three concentric layers of different shades of pink. Two thin pink lines intersect at the top left, forming a large 'V' shape that frames the circles. The text 'VI-CONCLUSIONES' is positioned in the lower-left area of the composition.

VI-CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

PRIMERA.- Se propone por primera vez para su uso como probiótico en piscicultura marina a *Vagococcus fluvialis*, cepa L21, por sus excelentes resultados, tanto *in vitro* como *in vivo*.

SEGUNDA.- Se propone por primera vez para su uso como probiótico en piscicultura marina a *Enterococcus gallinarum*, cepa L1, por su comportamiento adecuado, tanto *in vitro* como *in vivo*.

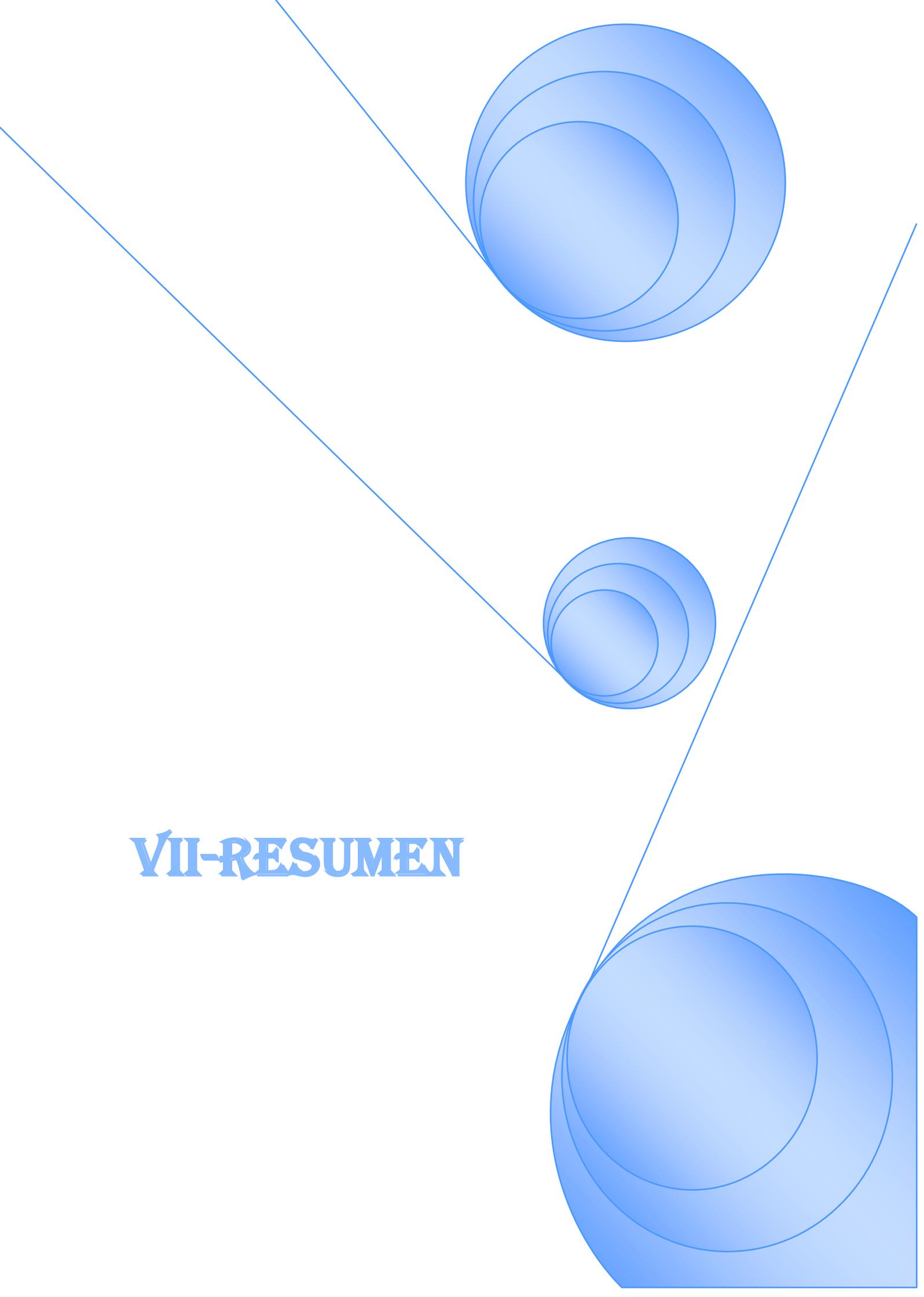
TERCERA.- *Vagococcus fluvialis* L21 y *Enterococcus gallinarum* L1 son cepas probióticas que pueden utilizarse con efectividad para el control de la infección por *Vibrio anguillarum* en marinocultura.

CUARTA.- Consideramos imprescindible integrar junto a las determinaciones clásicas *in vitro*, pruebas *in vivo* de una cepa probiótica antes de recomendar como definitivo su uso para una determinada especie.

QUINTA.- Las técnicas para caracterizar y sugerir un nuevo probiótico en una especie tienen que depender de la forma de uso del producto final, cepa viva o sustancia antibacteriana extraídas, en su caso.

SEXTA.- La determinación de la adherencia o la exclusión competitiva de una cepa al mucus intestinal ofrece resultados más precisos mediante el método por radioactividad que por el método de fluorescencia.

VII-RESUMEN



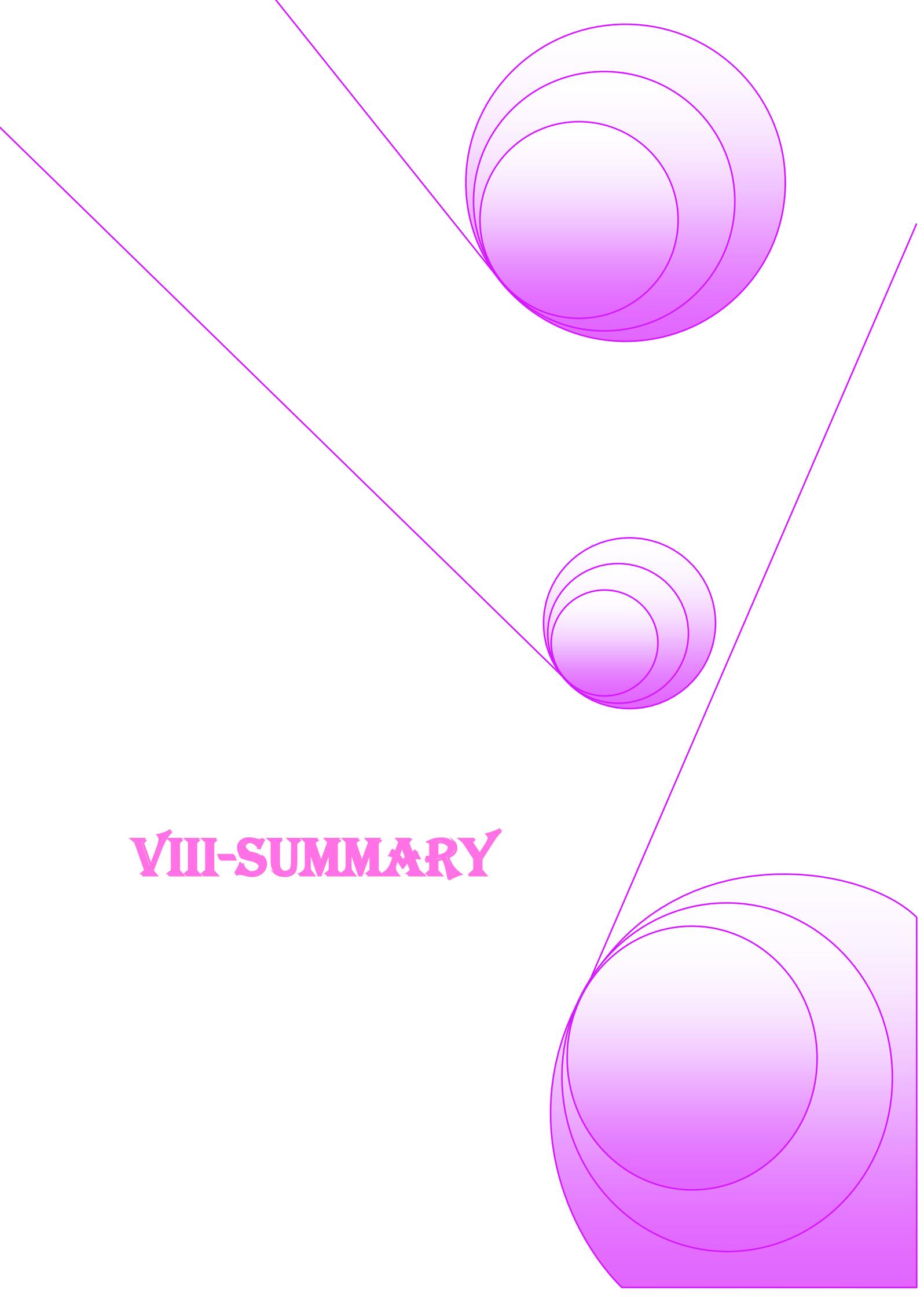
VII.- RESUMEN

La aplicación de métodos preventivos en la acuicultura, en los últimos años, mediante antibióticos, inmunoestimulantes o vacunas, no ha resuelto el problema de las enfermedades infectocontagiosas de manera definitiva. De aquí que se haga necesario explorar otros métodos de control de las enfermedades, que sean sostenibles desde el punto de vista del cuidado del medio ambiente, e íntegros con la salud general de los peces, como sucede con el uso de probióticos.

En el presente trabajo nos hemos planteado como finalidad la descripción y evaluación de nuevas cepas probióticas, obtenidas a partir de especies de peces marinos de interés actual para la acuicultura, y que comparten, de hecho, un hábitat común cuando se cultivan en zonas suratlánticas o mediterráneas, como la dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), corvina (*Argyrosomus regius*) y lenguado (*Solea solea*). Hemos identificado y evaluado completamente la actividad probiótica de 4 cepas de las 523 cepas aisladas originalmente. Para su evaluación hemos utilizado pruebas *in vitro*: producción de efecto inhibitorio del crecimiento frente a patógenos, producción de sustancias antibacterianas, competición por nutrientes, resistencia a la bilis, resistencia al pH, hidrofobicidad de la superficie celular, exclusión competitiva y crecimiento en el mucus intestinal de los peces. También hemos realizado una evaluación con pruebas *in vivo*. Concretamente se ha comprobado la inocuidad en la lubina de las cepas probióticas preseleccionadas, y se ha medido el efecto protector de las cepas frente una infección con *Vibrio anguillarum*. En algunos casos, se ha realizado la evaluación de una misma prueba mediante métodos alternativos.

Hemos encontrado muy buenos resultados como probiótico para la cepa *Vagococcus fluvialis* L21, y un comportamiento adecuado para la cepa *Enterococcus gallinarum* L1, tanto *in vitro* como *in vivo*. Ambas han protegido con efectividad a la lubina frente a una infección experimental con *Vibrio anguillarum*, presentando un porcentaje relativo de supervivencia del 42,3 y 20%, respectivamente, respecto al grupo control. Es la primera vez que se propone el uso de *V. fluvialis* como probiótico para la acuicultura marina. Sugerimos que, en función de la forma de administración de una cepa probiótica, la evaluación de su actividad debe hacerse utilizando una batería de pruebas diferentes.

VIII-SUMMARY

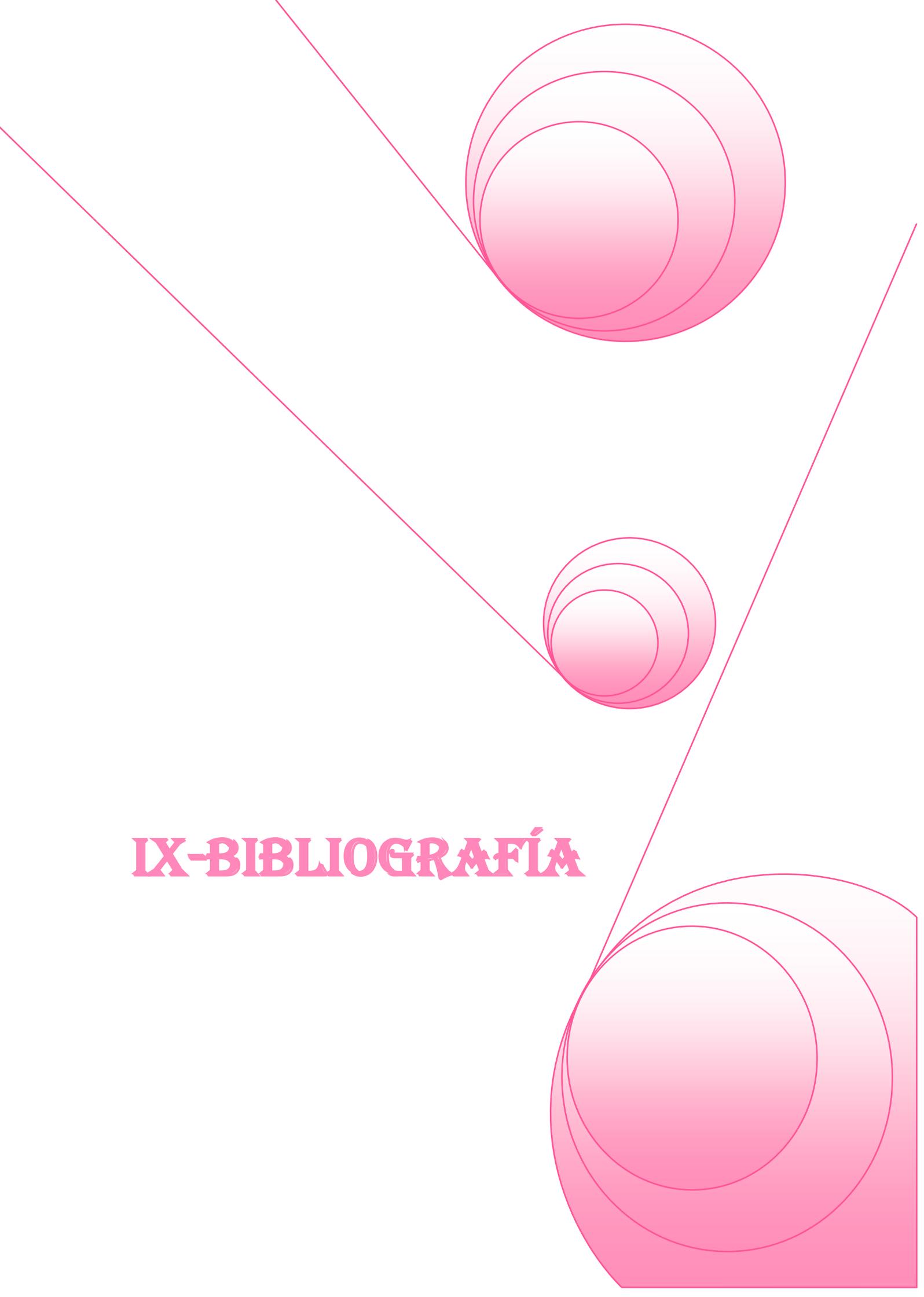


VIII.- SUMMARY

In the last years, use of antibiotics, immunostimulants or vaccines as preventive methods in aquaculture has not solved the incidence of infectocontagious diseases, finally. To this effect, other methods for controlling the diseases must be explored, more careful with marine environment, but also integral with fish health, that it occurs with probiotics.

We have tried to describe and evaluate new probiotic strains, as the main objective of the present work, which have been obtained from marine fish species with importance for aquaculture, and which, in fact, are sharing similar mediterranean or sur-atlantic places by culturing, such as gilthead seabream (*Sparus aurata*), sea bass (*Dicentrarchus labrax*), meagre (*Argyrosomus regius*) and sole (*Solea solea*). Four from 523 originally isolated strains have been identified and whole evaluated. Evaluation was made by *in vitro* tests: growth inhibition of pathogens by co-culture, production of antibacterial substances, competition by nutrients, fish bile and pH resistance, adhesion and competitive exclusion and growth in intestinal mucus of fish. We have also included in this evaluation some *in vivo* tests. Particularly, a harmless test and the level of protection against a fish challenge with *Vibrio anguillarum* were carried out in health European sea bass with pre-selected probiotic strains. In some cases, the evaluation of tests has also been carried out by other alternative methods.

Vagococcus fluvialis L21 and *Enterococcus gallinarum* L1 have showed very good properties as probiotic strains for marine culture, as much *in vitro* as *in vivo* tests. Both bacterial strains have produced a very good protection of sea bass against experimental challenge with *V. anguillarum*, showing a relative percent survival 42.3 and 20%, respectively, respect control group. This is the first time proposing the probiotic effect of *V. fluvialis* for marine fish aquaculture. We also suggest that evaluation of probiotic activity must be done by a different way, assembling different tests, according to the method of administration of a probiotic strain in the experimental diet.

The page features three decorative elements consisting of concentric circles with a pink-to-white gradient, positioned at the top, middle, and bottom right. Two thin pink lines intersect at the top left, forming a large 'V' shape that frames the central and bottom-right elements.

IX-BIBLIOGRAFÍA

IX.- BIBLIOGRAFÍA

- Abbass, A., Sharifuzzaman, S.M., Austin, B. 2010. Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 33, 31-37.
- Abelli, L., Randelli, E., Carnevali, O., Picchiatti, S., 2009. Stimulation of gut immune system by early administration of probiotic strains in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata*. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology* 1163, 340–342.
- Actis, L., Tolmasky, M. Crosa, J. 1999. Vibriosis in “Fish Diseases and Disorders” Vol. 3: Viral, bacterial and fungal infections (Eds P.t.k.Woo And D.w. Bruno), Cab International, London, UK. 523-557.
- Agaba, M., Douglas, R., Zheng, D., Dick, C., Dickson, X., James, R., Alan, J., Teale, J. 2005. Cloning and functional characterisation of polyunsaturated fatty acid elongases of marine and freshwater teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 142, 342-352.
- Agius, C., Horna, M., Ward, P. 1983. Immunization of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, against vibriosis: comparison of an extract antigen with whole cell bacterins by oral and intraperitoneal routes. *Journal Fish Diseases* 6, 129-134.
- Aguirre, G. 1993. Aplicación de probióticos en Acuicultura. Tesis Doctoral. UANI, Monterrey- Nuevo León, 97.
- Ai, Q. H., Mai, K. S., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W. Li, H. 2007. Effects of dietary β -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish & Shellfish Immunology* 22, 394-402.

- Alavandi, S., Vijayan, K., Santiago, T., Poornima, M., Jithendran, K., Ali, S., Rajan, S. 2004. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvalis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) Fish & Shellfish Immunology 17, 115-120.
- Alderman, DJ. 1998. Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. Review Science Technology 15 (2), 603-632.
- Al-Harbi, A., Uddin, N. 2005. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. Aquaculture 250, 566-572.
- Aly, S., Abdel-Galil, Y., Abdel-Aziz, A., Mohamed, M. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish & Shellfish Immunology 25, 128-136.
- Anderson, D., Jeney, G. 1992. Immunostimulants added to injected *Aeromonas salmonicida* bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinary Immunology Immunopathology 34,379-389.
- Anderson, J., Conroy, D. 1970. *Vibrio* Disease in Marine Fish In: A Symposium of fishes and shellfishes. Snieszko, F.F. (Ed), Special Publication, 5. American Fisheries Society. USA.
- Anderson, R., Hedlund, B. 1983. HPLC Analysis of organic acids in lactic acid fermented vegetable. Lebensm Unters Forsch 176, 440-443.
- Antony, S., y Philip, R. 2006. Bioremediation in Shrimp Culture Systems. NAGA, WorldFish Center Quarterly 29, 3-4.
- Aoki, T., Kitao, T., Watanabe, S., Takeshita, S. 1984. Drug resistance and R plasmids in *Vibrio anguillarum* isolated in cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*). Microbiology Immunology 28, 1-9.

- APROMAR 2011. Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos. La acuicultura marina de peces en España. <http://www.apromar.es/informes.asp>.
- Arahal, D., Sanchez, E., Macián, M.C., Garay, E. 2008. Value of rec N sequences for species identification and a phylogenetic marker within the family "*Leuconostocaceae*". *International Microbiology* 11, 33-39.
- Askarian, F., Kousha, A. Salma, W., Ringø, E. 2011 .The effect of lactic acid bacteria administration on growth, digestive enzyme activity and gut microbiota in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga *Huso huso*) fry. *Aquaculture Nutrition* 17 (5), 488-497.
- Aubin, J., Gatesoupe, F.J., Labbé, L., Lebrun, L. 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture Research* 36, 758–767.
- Austin, B., Austin, D. 1999. *Bacterial Fish Pathogens: Disease of farmed and wild fish*, 3rd Ed. Springer-verlag Kg, Berlin, Germany.
- Austin, B., Baudet, E., Stobie, M. 1992. Inhibition of bacterial fish pathogens by *tetraselmis suecica*. *Journal of Fish Diseases* 15, 55-61.
- Austin, B., Stuckey, L., Robertson, P., Efendi, I. Griffith, D. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* efective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal Fish Diseases* 18, 93-96.
- Avella, M., Olivotto, I., Silvi, S., Place, A. Carnevali, O. 2010. Effect of dietary probiotics on clownfish: a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish. *Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology* 298(2), 234-238.
- Avella, M., Olivotto, I., Silvi, S., Ribecco, C., Cresci. A., Palermo, F., Polzonetti, A., Carnevali, O. 2011. Use of *Enterococcus faecium* to improve common sole (*Solea solea*) larviculture. *Aquaculture* 315 (3-4), 384-393.

- Avendaño, R., Riquelme, C. 1999. Establishment of mixed probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquaculture Research* 30, 893-900.
- Axelsson, L., 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A (eds). *Lactic Acid Bacteria*. CRC, Inc. New York, USA. 603.
- Baffone, W., Pianetti, A., Bruscolini, F., Barbieri, E., Citterio, B. 2000. Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. *International Journal Food Microbiology* 54, 9–18.
- Bagni, M., Archetti, L., Amadori, M. and Marino, G., 2000. Effect of long-term oral administration of an immunostimulant diet on innate immunity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 47, 745-751.
- Bagni, M., Romano, N., Finoia, M., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P., Sarti, M., Marino, G. 2005. Short- and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunology* 18, 311-325.
- Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Múzquiz JL. 2009. Effect of *Lactococcus lactis* CLFP 100 and *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 on *Aeromonas salmonicida* Infection in brown trout (*Salmo trutta*). *Journal Molecular Microbiology Biotechnology* 17(3), 153-157.
- Balcázar JL., de Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D., Muzquiz J.L. 2006. The rol of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114, 173-186.
- Balcázar JL., Vendrell D., De Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Gironés O., Múzquiz JL. 2007. *In vitro* adhesión and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria fish pathogens. *Veterinary Microbiology* 122, 373-380.

- Bandyopadhyay, P., Das Mohapatra, P. 2009. Effect of a probiotic bacterium *Bacillus circulans* PB7 in the formulated diets: on growth, nutritional quality and immunity of *Catla catla*. *Fish Physiology Biochemistry* 35, 467-478
- Barbosa, J., Gibbs, P., Teixeira, P. 2010. Virulence factors among isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control* 21, 651-656.
- Bauer, A., Kirby W., Sherris, J., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal Clinical Pathology* 45, 493-496.
- Bezkorovainy, A. 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *American Journal of Clinical Nutrition* 73(2), 399-405.
- Bjorn, B., Hormbaek, T., Jacobsen, T., Barkholt, V., Granly, A. 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packet meats, culture, isolation, bacteriocin, identification, and meat application experiments. *International Journal Food Microbiology* 83(2), 171-184.
- Bogut, I., Milakovic, Z., Bukvic, Z., Brkic, S., Zimmer, R. 1998. Influence of probiotic (*Streptococcus faecium* M74) on growth and content of intestinal microflora in carp (*Cyprinus carpio*). *Journal Animal Science* 43, 231-235.
- Bruno, M., Montville, T. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Environment Microbiology* 59, 3003–3010.
- Brunt, J., Austin, B. 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Diseases* 28, 693–701.
- Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., Austin, B. 2007. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal Fish Diseases* 30 (10), 573-579.

- Buller, N. 2004. Biochemical Identification Tables. En: Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. CABI Publishing, CAB International. Wallingford, Oxfordshire OX10 8DE. Reino Unido.
- Burrells, C., William, P., Forno, P. 2001. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 1. Effects on resistance to diseases in salmonids. *Aquaculture* 199, 159-169.
- Cabello, F. 2004. Antibióticos y acuicultura en Chile: Consecuencias para la salud humana y animal. *Revista Médica Chilena* 132,1001-1006.
- Cahill, M. 1990. Bacterial flora of fish. A review. *Microbial Ecology* 19, 21-41.
- Campos, CA., Rodríguez, O., Calo-Mata, P., Prado, M., Barros Velázquez, J. 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Research International* 39, 356-364.
- Cano, M., Alonso, C., Garcia-Rosado, E., Rodríguez, S., Castro, D. Borrego, J. 2006. Lymphocystis disease virus detection in asymptomatic cultured gilt-head seabream (*Sparus aurata*, L.) using an immunoblot assay. *Veterinary Microbiology* 113,137-141.
- Capkin, E., Altinok, I. 2008. Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis. *Journal Applied Microbiology* 106(4), 1147-1153.
- Carnevali, O., deVivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S., Cresci, A. 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.) with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* 258(1-4), 430-438.

- Carnevali, O., Zamponi, M., Sulpizio, R., Rollo, A., Nardi, M., Orpianesi, C., Silvi, S., Caggiano, M., Polzonetti, A., Cresci, A. 2004. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *International Aquaculture* 12, 377–386.
- Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.L., Schmidely, P., Mariojouis, C. 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture* 275, 182–193.
- Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chima, L. 2010. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 28(4), 622–631.
- Chabrillón, M., Rico, R.M., Arijo, S., Diaz-Rosales, P., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A. 2006. Interference of *Listonella anguillarum* with potential probiotic microorganisms isolated from farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research* 37, 78–86.
- Chabrillón, M., Rico, R.M., Arijo, S., Diaz-Rosales, P., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A. 2005. Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases* 28, 531–537.
- Chang, C., Liu, W., 2002. An evaluation of two probiotics bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Journal of Fish Diseases* 25, 311–315.
- Chen, C., Chen, S. 2001. Water quality management with *Bacillus spp.* in the high-density culture of red-parrot fish *Cichlasomia citrinellum* 9 C synspilum. *Nature Ambient Journal Aquaculture* 63, 66–73.

- Chikindas, M., García-Garcera, M., Driesessen, A., Ledebøer, A., Nissen-Mejer, V., Abee, T., Konings, W. Venema, G. 1993. Pediocin PA-1, a Bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 Forms Hydrophilic Pores in the Cytoplasmic Membrane of Target Cells. *Applied Environment Microbiology* 59, 3577-3584.
- Chistiakov, D., Kabanov, F., Troepolskaya, D., Tischenko, M. 2010. A variant of the interleukin-1b gene in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., is associated with increased resistance against *Vibrio anguillarum*. *Journal Fish Diseases* 33, 759-767.
- Christie, W. 1982. Lipid analysis. Oxford: Pergamon Press. Canada Ltd., Toronto
- Chythanya, R., Karunasagar, I., Karunasagar, I. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture* 208, 1-10.
- Cintas, L., Casaus, P., Hernández, P. 2000. Bacterias lácticas de origen alimentario: consideraciones taxonómicas y filogenéticas. *Alimentaria* 1, 61-70.
- Collado, M., Grzeskowiak, Ł., Salminen, S. 2007. Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Current Microbiology* 55, 260–265.
- Collins, M., Farrow, J., Phillips, B., Feresu, S., Jones, D. 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and Some Catalase-Negative, Asporogenous, Rod-Shaped Bacteria from Poultry in a New Genus, *Carnobacterium*. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology* 37 (4), 310-316.
- Colomi, A. 1987. Biology of *Cryptocaryon irritans* and Strategies for its Control. *Aquaculture* 67, 236-237.
- Crosa, J.H. 1980. A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system. *Nature* 284, 566-568.

- Cuesta, A., Esteban, M., Meseguer, J. 2002. Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata*, L.) and its modulation by vitamin C. *Fish & Shellfish Immunology* 13, 97-109.
- Dahiya, R., Speck, M. 1968. Hidrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. *Journal Dairy Science* 51, 1568-1572.
- Daniels, C., Merrifield, D., Boothroyd, D., Davies, S., Factor, J., y Arnold, K., 2010. Effect of dietary *Bacillus* spp. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. *Aquaculture* 304 (1-4) 49-57.
- Desriac, F., Defer, D., Bourgougnon, N., Brillet, B., Le Chevalier, P., Fleury, Y. 2010. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: Inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Marine Drugs* 8(4), 1153-1177.
- Díaz-Rosales, P., Salinas, I., Rodríguez, A. 2006. Gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) innate immune response alter dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish & Shellfish Immunology* 20, 482-492.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D., Carnevali, O., Picchiatti, S., Avella, M., Daniels, C., Guroy, D., Davies, S. 2011. Microbial manipulations to improve fish health and production: A Mediterranean perspective. *Fish & Shellfish Immunology* 30, 1-16.
- Doeschate, K. Coyne, V. 2008. Improved growth rate in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* 284 (1-4) 174-179.
- Doménech, A., Fernández-Garayzábal, J., Pascual, C., García, J., Cutuli, M., Moreno, M., Collins, M., Domínguez, L. 1996. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *Journal of Fish Diseases* 19, 33-38.

- Donlan, R. 2002. Biofilm: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8 (9), 881-890.
- Dopazo, C., Lemos, M., Lodeiros, C., Bolinches, J., Barja, J., Toranzo, A. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Bacteriology* 65, 97-101.
- Douillet, P. 2000a. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic culture conditions 1. Evaluation of commercial products and pure isolates. *Aquaculture* 182, 249-260.
- Douillet, P. 2000b. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic culture conditions 2. Use of single and multiple bacterial probiotics. *Aquaculture* 182, 241-248.
- Douillet, P., Langdon, C. 1993. Effects of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. *The Biological Bulletin* 184, 36-51.
- Douillet, P., Langdon, C. 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg). *Aquaculture* 119, 25-40.
- Duff, D. 1942. The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. *Journal Immunology* 44, 87-94.
- Duwat, P., Cesselin, B., Sourice, S., Gruss, A. 2000. *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress response and survival. *International Journal of Food Microbiology* 55, 83-86.
- Eiras, J. 1994. Elementos de ictiopatología. Fundação Eng. António de Almeida. Porto, 339.
- ElAamri, F., Padilla, D., Acosta, F., Caballero, M., Roo, J., Bravo, J., Vivas, J., Real, F. 2010. First report of *Streptococcus iniae* in red porgy (*Pagrus pagrus*, L). *Journal of Fish Diseases* 33, 901-906.

- Esteban, M.A., Cuesta, A., Ortuno, J., Meseguer J. 2001. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Fish & Shellfish Immunology* 11, 303–315.
- Esteve-Gassent, M. D., Barrera, R., Amaro, C. 2004. Efficacy of oral re-immunisation after immersion vaccination against *Vibrio vulnificus* in farmed European eels. *Aquaculture* 231 (1-4), 9-22.
- FAO. 2002.- El estado mundial de la pesca y la acuicultura.
- FAO. 2008. La acuicultura: única forma de hacer frente al futuro déficit de pescado. Reunión de la FAO para la contribución de la acuicultura al desarrollo sostenible. Roma 2008. <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2008/1000701/index>.
- Ferguson, RM., Merrifield, DL., Harper, GM., Rawling, MD., Mustafa, S., Picchiatti, S., Balcázar, JL., Davies, SJ. 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal Applied Microbiology* 109(3), 851-862.
- Fgaier, H., y Eberl, H. 2011 Antagonistic control of microbial pathogens under iron limitations by siderophore producing bacteria in a chemist at setup. *Journal of Theoretical Biology* 273, 103–114.
- Finn, J. 1970. The protective mechanisms in diseases of fish. *Veterinary Bulletin*, Weybridge 40, 873-886.
- Fjellheim, A., Klinkenberg, G., Skjermo, J., Aasen, I., Vadstein, O. 2010. Selection of candidate probionts by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Veterinary Microbiology* 144 (1-2), 153-159.
- Fletcher, T.C. 1981. Non-antibody molecules and the defence mechanisms of fish. En: Pickering, A.D. (Ed.). *Stress and Fish*, Acad Press. 171-183.

- Folch, J., Lees, M. Sloane-Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Fredrickson, A. Stephanopolous, G. 1981. Microbial competition. *Science* 213, 972-979.
- Fukami, K., Nishijima, T., Hata, Y. 1992. Availability of deep seawater and effects of bacteria isolated from deep seawater on the mass culture of food microalga *Chaetoceros ceratosporum*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58 (5), 931–936.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal Applied Bacteriology* 66, 365-378.
- Galindo-Villegas, J., Masumoto, T., Hosokawa, H. 2002. Immunostimulants and diseases resistance in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. S-26. En: Proceedings of the 5th Korea-Japan Biannual Joint Meeting. Kunsan National University, Kunsan, Korea.
- García De la Banda I, Lobo C., León-Rubio, J., Tapia-Paniagua S., Balebona, M, Moriñigo M, Moreno-Ventas X., Lucas L., Linares F., Arce F, Arijo S. 2010. Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture* 306, 281-288.
- García de la Banda, I., Chereguini, O., Rasines, I. 1992. Influencia de la adición de bacteria lácticas en el cultivo larvario del rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). *Boletín del Instituto Español Oceanográfico* 8, 247–254.
- García, T., Otto, K., Kjelleberg, S., Nelson, D.R. 1997. Growth of *Vibrio anguillarum* in salmon intestinal mucus. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (3), 1034–1039.
- Gatesoupe, F. 1991. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 96, 335–342.

- Gatesoupe, F. 1994. Lactic acid bacteria increases the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. *Aquatic of Living Resource* 8, 277-282.
- Gatesoupe, F. 2002. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture* 212, 347–360.
- Gatesoupe, F. 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 14 (1-3), 107-114.
- Gatesoupe, F., Lambert, C., Nicolas, J. 1999. Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Journal of Applied Microbiology* 87 (5), 757-763.
- Gatesoupe, F., Zambonino-Infante, J., Cahu, C., Quazuguel, P. 1997. Early weaning of seabass larvae, *Dicentrarchus labrax*: the effect on microbiota, with particular attention to iron supply and exoenzymes. *Aquaculture* 158, 117–127.
- Gibson, L., Woodworth, J., George, A. 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture* 169, 111–120.
- Gildberg, A., Johansen, A., Bøggwald, J. 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture* 138, 23–34.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H. 1998. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture* 167, 103–113.

- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E., Ringø, E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia* 352, 279–285.
- Gill, H. 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17 (5), 755–773.
- Gobeli, S., Goldschmidt-Clermont, J., Frey, S., Burr, E. 2009. *Pseudomonas chlororaphis* strain JF3835 reduces mortality of juvenile perch, *Perca fluviatilis* L., caused by *Aeromonas sobria*. *Journal of Fish Diseases* 32 (7), 597-602.
- Gómez, B., Esteves, C., Palazzo, I., Darini, A., Felis, G., Sechi, L., Franco, B., De Martinis, E. 2008. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian food. *Food Microbiology* 25, 668-675.
- Gómez-Gil B, Thompson, F., Thompson, C., García-Gasca, A., Roque, A., Swings, J. 2004. *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 261-265.
- Gómez-Gil, B., Roque, A., Velasco-Blanco, G. 2002. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture* 211, 43-48.
- Gómez-Gil, B., Roque A., Turnbull J.F. 2000. The use and selection of probiotic for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191 (1-3), 259-270.
- González, S., Osorio C., Santos, Y. 2003. Development of a PCR-based method for the detection of *Listonella anguillarum* in fish tissues and blood samples. *Diseases of Aquatic Organisms* 55, 109-115.
- Gopalakannan, A., Arul, V. 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture* 255, 179-187.

- Gram, L., Løvold, T., Nielsen, J., Melchiorson, J., Spanggaard, B. 2001. *In vitro* antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture* 199, 1-11.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Hurber, I., Nielsen, T. 1999. Inabitation of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2 a possible probiotic treatment of fish. *Applied Environmental Microbiology* 65, 969-973.
- Grant, K., Dickinson, J., Collins, M., Kroll, R. 1992. Rapid of *Aerococcus viridans* using the polymerase chain reaction and an oligonucleotide probe. *FEMS Microbiology Letters* 95, 63-68.
- Grzésekowiak, L., Collado, M., Vesterlund, S., Mazurkiewicz, J., Salminen, S. 2011. Adhesion abilities of commensal fish bacteria by use of mucus model system: Quantitative analysis. *Aquaculture* 318, 33-36.
- Gueimonde, M., Jalonen, L., He, F., Hiramatsu, M., Salminen, S. 2006. Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacillus. *Food Research International* 39 (4), 467-471.
- Günther, G., Jiménez-Montealegre, R. 2004. Efecto del probiótico *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) en laboratorio. *Revista Biología Tropical* 52 (4), 937-943.
- Gullian, M., Thompson, F., Rodriguez, J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233, 1-14.
- Gunasekara, A., Rekecki, A., Baruah, K., Bossier, P., Van den Broeck, W. 2010. Evaluation of probiotic effect of *Aeromonas hydrophila* on the development of the digestive tract of germ-free *Artemia franciscana* nauplii. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 393 (1-2) 78-82.

- Hagi, T., Minagawa, A., Shima, J. 2009. Dynamics of genetically modified *Lactococcus lactis* in simulated natural environments and impacts on microbial communities. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107 (3), 339-343.
- Hardie, L., Fletcher, T., Secombes C. 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 95, 201-214.
- Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo, M. 2010. Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV). *Fish & Shellfish Immunology* 29 (5), 868-874.
- Harikrishnan R, Kim MC, Kim JS, Balasundaram C, Heo, M. 2011. Probiotics and herbal mixtures enhance the growth, blood constituents, and nonspecific immune response in *Paralichthys olivaceus* against *Streptococcus parauberis*. *Fish & Shellfish Immunology* 31 (82), 310-317.
- Havarstein, L.S., Brurberg, M.,Eijsink, V., Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70 (2), 113-128.
- Hirata, H., Murata, O., Yamada, S., Ishitani, H., Wachi, M. 1998. Probiotic cultura of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 387, 495-498.
- Hjelm, M., Bergh, Ø., Riaza, A., Nielsen, J., Melchiorson, J., Jensen, S., Duncan, H., Ahrens, P., Birbeck, H., Gram, L. 2004. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 360-371.
- Hjeltnes, B Roberst, J. 1993. Vibriosis. En: *Bacterial Diseases of Fish*. V. Roberts RJ. y Bromage, NR., (Eds). Halsted Press, New York, 109-12.
- Holmstrom, C., Egan, S., Franks, A., McCloy, S., Kjelleberg, S. 2002. Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiology Ecology* 41, 47-58.

- Holzappel, W., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Journal Clinical Nutrition* 73, 365-375.
- Honda, S. 2004. Different sources of non-nutritive immunostimulants for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Kochi University, Japan Bs. C. Thesis 78.
- Horne, M., y Baxendale, A. 1983. The adhesion of *Vibrio anguillarum* to host tissues and its role in pathogenesis. *Journal Fish Diseases* 6, 461-71.
- Hoyles, L., Lawson, P., Foster, G., Falsen, E., Ohlen, M., Grainger, J., Collins, M. 2000. *Vagococcus fessus* sp. nov. Isolated from seal and harbour porpoise. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1151-1154.
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2003R1831:20100901:ES:PDF>
- Hyuk, J., Sung-Ho, A., Myung, D., Chan, W. 2008. Use of hydrogen peroxide as an effective disinfectant to *Actinobacillus ureae*. *Process Biochemistry* 43, 225-228.
- Irianto, A., Austin, B. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 25, 333-342.
- Isolauri, E., Sütas, Y., KanKaapää, P., Arvilommi, H., Salminen, S. 2001. Probiotic: Effect on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 444-450.
- Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Noboru, T., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M., Takahashi, Y. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture* 164, 277-288.
- Izquierdo, M.S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T., Kitjima, C. 1990. Optimum EFA levels in artemia to meet EFA requirements of red seabream (*Pagrus major*). En: Takeda, M., Watanabe, T. (Eds). *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture*. Tokyo: University Fisheries 221-231.

- Jaffrés, E., Sohier, D., Leroi, F., Pilet, M., Prevóst, H., Joffraud, J., Dousset, X. 2009. Study of the bacteria ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology* 131, 20-29.
- Janda, J.M. 1985. Biochemical and exoenzymatic properties of *Aeromonas* species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 3, 223-232.
- Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z., Anderson, D. 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture* 154, 1-15.
- Jöborn, A., Olsson, J.C., Westerdahl, A., Conway, P.L., Kjelleberg, S. 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. *Journal of Fish Diseases* 20, 383-392.
- Joshi, S. 2003. Top 5 Marine Fish Parasites. *Aquarium Fish Magazine*, September, 15-17.
- Jun, L., Woo, N. 2003. Pathogenicity of vibrio in fish. A review *Journal Ocean, University of China* 2 (2), 117-128.
- Kakuta, I. 1998. Reduction of stress response in carp, *Cyprinus carpio* L., held under deteriorating environmental conditions, by oral administration of bovine lactoferrin. *Journal of Fish Diseases* 21, 161-168.
- Kamilya, D., Ghosh, D., Bandyopadhyay, S., Mal, B., Maiti, T. 2006. *In vitro* effects of bovine lactoferrin, mushroom glucan and *Abrus* agglutinin on Indian major carp, catla (*Catla catla*) head kidney leukocytes. *Aquaculture* 253 (1-4), 130-139.
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128, 203-209.

- Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O., Kok, J. 2003. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Applied of Environmental Microbiology* 69, 1589-1597.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J., Gibson, L. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274, 1-14.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, M., Lategan M., Gibson. L. 2009. Screening for probiotics of Greenshell mussel larvae, *Perna canaliculus*, using a larval challenge bioassay. *Aquaculture* 296 (1-2), 159-164.
- Kim, D., Austin, B. 2008. Characterization of probiotic carnobacterium isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Letter in Applied Microbiology* 47,141-147.
- Kim, J., Harikrishnan, R., Kim, M., Balasundaram, C., Heo, MS. 2010. Dietary administrations of *Zooshikella* sp. enhance the innate immune response and disease resistance of *Paralichthys olivaceus* against *Streptococcus iniae*. *Fish & Shellfish Immunology* 29 (1), 104-110.
- Kirchhoff, T., D'Antignana, T, Leef, M., Hayward, C., Wilkinson, R, Nowak, B. 2011. Effects of immunostimulants on ranched southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*: immune response, health and performance. *Journal of Fish Biology* 79 (2), 331-355.
- Klenhamer, T. 1993. Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiololy* 12, 39-86.
- Klewicki, R., Klewicka, E. 2004. Antagonistic activity of lactic acid bacteria as probiotics against selected bacteria of the *Enterobacteriaceae* family in the presence of polyols and their galactosyl derivatives. *Biotechnology Letters* 26, 317-320.
- Kogan, G. Kocher, A. 2007. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Science* 109, 161-165.

- Kontchou, Y., Blondeau, R. 1990. Isolation and characterization of hydrogen peroxide producing *Aerococcus* sp. from soil samples. FEMS Microbiology Letter 68, 323-327.
- Korun, J., Timur, G. 2008. Marine vibrios associated with diseased sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. Journal of Fisheries Sciences 2 (1), 66-76.
- Kumari, J., Sahoo, P.K. 2006. Dietary immunostimulants influence specific immune response and resistance of healthy and immunocompromised Asian catfish *Clarias batrachus* to *Aeromonas hydrophila* infection. Diseases of Aquatic Organism 70, 63-70.
- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M.A., Guzmán-Méndez, B.E., López-Madrid, W. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 216, 193-201.
- Lategan, M., Gibson, L. 2003. Antagonistic activity of *Aeromonas media* strain A199 against *Saprolegnia* sp., an opportunistic pathogen of the eel, *Anguilla australis* Richardson. Journal of Fish Diseases 26, 147-153.
- Lategan, M., Torpy, F., Gibson, L. 2004. Biocontrol of saprolegniosis in silver perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell) by *Aeromonas media* strain A199. Aquaculture 235, 77-88.
- Lauzon, H., Gudmundsdottir, S., Steinarsson, A., Oddgeirsson, M., Martinsdottir, E., Gudmundsdottir, B. 2010. Impact of probiotic intervention on microbial load and performance of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles. Aquaculture 310, 139-144.
- Lawson, P., Falsen, E., Cotta, M., Terence, R. 2007. *Vagococcus elongates* sp. isolated from a swine-maure storage pit. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57, 751-754.

- Lee, D., Ramos A, Macomber L, Shapleigh J. 2002. Taxis response of various denitrifying bacteria to nitrate and nitrite. *Applied of Environmental Microbiology* 68, 2140-2147.
- Leong, J. C., Fryer, J. 1993. Viral vaccines for aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, 225-240.
- Leung, K. 1987. The rol of the proteases of *Aeromonas hydrophila* in infections of rainbow trout. Ph.D. Thesis Faculty of Graduate Studies. University of Guelph. Guelph. Ontario. Canada.
- Lewis, W., Morris, D. 1986. Toxicity of nitrite to fish: a review. *Transactions of American Fish Society* 155, 183-195.
- Leyton, Y., Riquelme, C. 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Revista biología marina y oceanografía* 43 (3), 441-456.
- Li, J., Tan, B., Mai, K., 2009. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomalto oligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 291 (1-2), 35-40.
- Li, J., Tan, B., Mai, K., Ai, Q., Zhang, W., Xu, W., Liufu, Z., Ma, H. 2006. Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios. *Aquaculture* 253, 140-147.
- Limsuwan, T., Lovell, R. 1981. Intestinal synthesis and absorption of vitamin B12 in channel catfish. *Journal Nutrition* 111, 2125-2132.
- Liu, K., Chiu, Ch., Shiu, Y., Cheng, W. Liu, Ch. 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae *Fish & Shellfish Immunology* 28 (5-6), 837-844.

- Macey, B., Coyne, V. 2005. Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* 245, 249-261.
- Magariños, B., Couso, N., Noya, M., Merino, P., Toranzo, A.E., Lamas, J. 2001. Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 195, 17-21.
- Makras, L., De Vuyst, L. 2006. The *in vitro* inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *International Dairy Journal* 16, 1049-1057.
- Makridis, P., Martins, S., Vercauteren, T., Van Driessche, K., Decamp, O., Dinis, M. 2005. Evaluation of candidate probiotic strains for gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*) using an *in vivo* approach. *Letters in Applied Microbiology* 40, 274-277.
- Manning, T., Gibson, G. 2004. Prebiotics. *Best Practice in Research Clinical Gastroenterology* 18, 287-298.
- Mao, Jianqiang, Zhou, Guoqin, Chen, Bing, Du, Xuan, 2006. The effects of compound microorganisms on improving water quality. *Journal of Aquaculture* 27, 25-27.
- Martín, V., Vela, A., Gilbert, M., Cebolla, J., Goyache, J. Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F. 2007. Characterization of *Aerococcus viridans* isolates from swine clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 3053-3057.
- Merrifield, D., Harper, G., Mustafa, S., Carnevali, O., Picchiatti, S., Davies, S.J. 2011. Effect of dietary alginic acid on juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) intestinal microbial balance, intestinal histology and growth performance. *Cell Tissue Research* 344 (1), 135-146.
- Meunpol, O., Lopinyosiri, K., Menasveta, P. 2003. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 220, 437-448.
- Michael, S. 2002. Fighting Marine Parasites. *Aquarium Fish Magazine*, October, 25-26.

- Minshew, B., Jorgensen, J., Counts, W., Falkon. S. 1978. Association of hemolysin production hemagglutination of human erythrocytes and virulence for chicken embryos of extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Infection and Immunity* 20, 50-54.
- Mombelli, B., Gismondo, M.R. 2000. The use of probiotics in medicinal practice. *International Journal of Antimicrobial Agents* 16, 531-536.
- Montero, D., Fernandez-Vaquero, A., Tort, L., Caballero, M.J., Izquierdo, M. 2005. Efecto de los inmunoestimulantes en la resistencia a estrés en dorada (*Sparus aurata*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*). Comunicación oral. X Congreso Nacional de Acuicultura. Gandía, España.
- Montville, T.J., Chen, Y. 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied of Microbiology Biotechnology* 50, 511-519.
- Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164, 351–358.
- Motta, S. A., Brandelli, A. 2008. Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* sp. Strain P34. *World Journal Microbiology Biotechnology* 24, 641-646.
- Naik, A., Murthy, S., Ramesha, T. 1999. Effect of graded levels of G-probiotic on growth, survival and feed conversion of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Technology* 36, 63-66.
- Naiud, A., Bidlack, W., Clemens, R., 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food science and Nutrition* 38, 130-136.
- Nakai, T., Park, S. 2002. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research Microbiology* 153, 13-18.

- Nakai, T., Sugimoto, R., Park, K., Matsuoka, S., Mori, K., Nishioka, T., Maruyama, K. 1999. Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Diseases in Aquatic Organism* 37, 33-41.
- Namba, A., Mano, N., Hirose, H. 2007. Phylogenetic analysis of intestinal bacteria and their adhesive capability in relation to the intestinal mucus of carp. *Journal in Applied Microbiology* 102, 1307-1317.
- Naviner, M., Berge, P., Durand, P., Le Bris H. 1999. Antibacterial activity of the marine diatom, *Skeletonema costatum*, against aquaculture pathogens. *Aquaculture* 174, 15-24.
- Nayak, S.K. 2010. Probiotic and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology* 29, 2-14.
- Nikolopoulou, D., Moutou, E., Fountoulaki, B., Venou, B., Adamidou, S., Alexis, M. 2011. Patterns of gastric evacuation, digesta characteristics and pH changes along the gastrointestinal tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 162, (3) 157-288.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Bylund, G., Salminen, S., Lilius, E. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish & Shellfish Immunology* 15, 443-452.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., Bylund, G. 2001a. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture* 198, 229-236.
- Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G., Ouwehand, A. 2001b. Characterization of the properties of human and dairy derived probiotics for the prevention of infectious diseases in fish. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (6), 2430-2435.

- Noga, E., Smolowitz, R., Khoo, L.H. 2000. Pathology of shell disease in the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathburn (Decapoda: Portunidae). *Journal of Fish Diseases* 23, 389-399.
- Nogami, K. Maeda, M. 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Canadian Journal of Fisheries. Aquaculture Society* 49, 2373-2376.
- Nogami, K., Hamasaki, K., Maeda, M., Hirayama, K. 1997. Biocontrol method in aquaculture for rearing the swimming crab larvae *Portunus trituberculatus*. *Hydrobiologia* 358, 291-295.
- Norqvist, A., Bergman, A., Skogman, G., Wolf-Watz, H. 1994. A field trial with the live attenuated fish vaccine strain *Vibrio anguillarum* VAN 1000. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 14, 156-158.
- Norqvist, A., Hagstrlm, A., Wolf-Watz, H. 1989. Protection of rainbow trout against vibriosis and furunculosis by the use of attenuated strains of *Vibrio anguillarum*. *Applied Environmental Microbiology* 55, 1400-1405.
- Norqvist, A., Wolf-Watz, H. 1993. Characterization of a novel chromosomal virulence locus involved in expression of a major surface flagellar sheath antigen of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection Immunology* 61, 2434-2444.
- Nya, E., Austin, B. 2011. Development of immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila* after the dietary application of garlic. *Fish & Shellfish Immunology* 30 (3), 845-850.
- Ocaña, V., Bru, E., De Rui Holgado, A., Nader-Macias M. 1999. Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. *Journal of Genetic Applied Microbiology* 45, 203-12.

- Olsson, J., Joborn, A., Westerdahl, A., Blomberg, L., Kjelleberg, S., Conway, P. 1992. Is turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine a portal of entry for the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Journal of Fish Diseases* 19, 225-34.
- Olsson, J., Jöborn, A., Westerdahl, A., Blomberg, L., Kjelleberg, S., Conway, P. 1998. Survival, persistence, and proliferation of *Vibrio anguillarum* in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, intestine and faeces. *Journal of Fish Diseases* 21, 1-10.
- Orozco-Medina, C., Maeda-Martínez, M., López-Cortés, A. 2002. Effect of aerobic Gram-positive heterotrophic bacteria associated with *Artemia Franciscana* cysts on the survival and development of its larvae. *Aquaculture* 213, 15-29.
- Ortuño, J., Cuesta, A., Angeles Esteban, M. Meseguer, J. 2001. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 79, 167-180.
- Ortuño, J., Esteban, M., Meseguer, J. 2003. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 14, 145-156.
- O'Toole, R., Milton, D., Hörstedt, P., y Wolf-Watz, H. 1997. RpoN of the fish pathogen *Vibrio (Listonella) anguillarum* is essential for flagellum production and virulence by the water-borne but not intraperitoneal route of inoculation. *Microbiology* 143, 3849-3859.
- O'Toole, R., Von Hofsten, J., Rosqvist, R., Olsson, P., Wolf-Watz, H. 2004. Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*. *Microbiol Pathology* 37 (1), 41-46.
- Ouwehand, A., Salminen, S. 2003. *In vitro* adhesion assays for probiotics and their *in vivo* relevance. *Microbial Ecology of Health Diseases* 15, 175-178.

- Pacini F. 1854. Osservazioni microscopiche e deduzione patologiche sul colera asiatico. *Gazette Medica de Italiana Toscano Firenze* 6, 405-412.
- Palermo, F., Mosconi, G., Avella, M., Carnevali, O., Verdenelli, M., Cecchini, C., Polzonetti-Magni, A. 2011. Modulation of cortisol levels, endocannabinoid receptor 1A, proopiomelanocortin and thyroid hormone receptor alpha mRNA expressions by probiotics during sole (*Solea solea*) larval development. *General and Comparative Endocrinology* 171(3), 293-300.
- Pan, X., Wu, T., Zhang, L., Song, Z., Tang, H., Zhao, Z. 2008. *In vitro* evaluation on adherence and microbial properties of a candidate probiotic *Clostridium butyricum* CB2 for farmed fish. *Applied Microbiology* 105, 1623- 1629.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S., Sugita, H. 2004. Immune response in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102, 379-388.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S., Sugita, H. 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immuneresponse in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 243,241-254.
- Parker, B. 1974. Probiotic, the other half of the Antibiotic Story. *Animal Nutrition and Health* 29, 4-8.
- Pavanelli, G., Eiras, J., Takemoto, R. 1998. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Editora da Universidade Estadual de Maringá. Maringá, Paraná, Brasil. 264.
- Pazos, F. Santos, Y., Núñez, S., Toranzo, A. 1993. Increasing occurrence of *Flexibacter maritimus* in the marine aquaculture of Spain. *FHS/AFS News Letters* 21, 1-2.

- Pedersen K., Grisez L., Van Houdt R., Tiainen T., Ollevier F. Larsen J. 1999. Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. *Current Microbiology* 38, 183-189.
- Pedersen, A., Dalsgaard, A. 2003. Species composition and microbial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. *Environmental Microbiology* 5 (5), 395-402.
- Pellitero, P.A. 1988. Enfermedades producidas por parásitos en peces. En: Patología en acuicultura. Espinosa de los Monteros, J. y Labarta (Editores), Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura, CAICYT. Ediciones Mundi-Press Libros. Madrid. 215-326.
- Penagos, G., Borato, P., Iregui, C. 2009. Sistema inmune y vacunación de peces. *Acta Biológica de Colombia* 14 (1), 3-24.
- Pérez, T., Balcázar, J.L., Peix, A., Valverde, A., Velázquez, E., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I. 2010. *Lactococcus lactis* subsp. *tructae* subsp. nov. Isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 61(8), 1894-1898.
- Pérez, T., Balcázar, J.L., Merrifield, D., Carnevali, O., Gioacchini, G., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I. 2011. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 31, 2, 196-201.
- Phianphak, W., Rengpipat, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P. 1999. Probiotic use of *Lactobacillus* spp. for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal Science Research* 24, 10-15.
- Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M., Endo, M. 2006. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113(1-3), 339-347.

- Pirofski, L.A. Casadevall, A. 1998. Use of licensed vaccines for active immunization of the immunocompromised host. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 1-26.
- Planas, M., Pérez-Lorenzo, M., Hjelm, M., Gram, L., Øivind, I., Pintado, J. 2006. Probiotic effect *in vivo* of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio* (*Listonella anguillarum*) infections in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture* 255(1-4), 323-333.
- Planas, M., Vázquez, J., Marqués, J., Pérez-Lomba, R., González, M., Murado, M. 2004. Enhancement of rotifer (*Branchionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture* 240, 313-329.
- Poston, H. 1964. Effect of dietary vitamin K and sufaguanidine on blood coagulation time, microhematocrit and growth of immature brook trout. *Progressive Fish Culturist* 26, 59-64.
- Price, R., Lee, J. 1970. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. *Journal Milk Food Technology* 33, 13-18.
- Pulsford, AL., Crampe, M., Langston, A., Glynn, PJ. 1995. Modulatory effects of disease, stress, copper, TBT and vitamin E on the immune system of flatfish. *Fish & Shellfish Immunology* 5, 631-643.
- Queiroz, F., Boyd, C. 1998. Effects of a bacterial inoculums in channel catfish ponds. *Journal World Aquaculture Society* 29, 67-73.
- Raa, J. 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Review Fish Science* 4, 229-288.
- Raida, M., Larsen, J., Nielsen, M., Buchmann, K. 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *Journal of Fish Diseases* 26, 495-498.

- Rappuoli, R., Del Giudice, G. 1999. Identification of vaccine targets. Pag 1-17. En Vaccines: From Concept to Clinic. Paoletti, L., y McInnes, P. (Eds). Boca ratón: CRC Press. USA.
- Rawls, J., Samuel, B., Gordon, J. 2004. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. Proceedings National Academic Science USA 101, 4596-4601.
- Reglamento 1831/2003 del Consejo Europeo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal.
- Reid, G., Bruce, A. 2001. Selection of Lactobacillus strains for urogenital probiotic applications. Journal of Infectious Diseases 183 (S1), 77-80.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M.T., McCormick, J.K. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. Clinical Microbiology Reviews 16(4), 658-672.
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture 167, 301-313.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture 191, 271-288.
- Rico-Mora, R., Voltolina, D., Villaescusa-Celaya, J.A. 1998. Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (*Bacillariophyceae*) cultures. Aquaculture Engineering 19, 1-6.
- Ringo, E. Vadstein, O. 1998. Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. Journal of Applied Microbiology 84, 227-233.

- Ringo, E., Løvmo, L., Kristiansen, M., Bakken, I., Salinas, I., Myklebust, R., Olsen, R., Mayhew, T. 2010. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture Research* 41, 451-467.
- Ringo, E., Myklebust, R., Mayhew, T., Olsen, R. 2007. Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture* 268, 251-264.
- Riquelme, C., Araya, R., Escribano, R. 2000. Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture* 181, 25-36.
- Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M., Candia, M. 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 154, 17-26.
- Riquelme, C., Jorquera, M., Rojas, A., Avendaño, R., Reyes, N. 2001. Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 192, 111-119.
- Robertsen, B., Rorstad, G., Engstad, R.E., Raa, J. 1990. Enhancement of nonspecific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo-Salar* L, by a glucan from *Saccharomyces-cerevisiae* cell-walls. *Journal of Fish Diseases* 13, 391-400.
- Robertson, P., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P., Austin, B. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 185, 235-243.
- Rocha, A., Fernández-Alonso, M., Mas, V., Pérez, L., Estepa, A., Coll, J. 2002. Antibody response to a fragment of the protein G of VHS rhabdovirus in immunised trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 86, 89-99.
- Rodkhum C., Hirono I., Stork M., Di Lorenzo M., Crosa J.H. Aoki T. 2006. Putative virulence-related genes in *Vibrio anguillarum* identified by random genome sequencing. *Journal of Fish Diseases* 29, 157-166.

- Rodkhum, C., Hirono, I., Crosa, J., Aoki, T. 2005. Four novel hemolysin genes of *Vibrio anguillarum* and their virulence to rainbow trout. *Microbial Pathogen* 39, 109-119.
- Rojas, C., Vargas, P. 2008. Bacteriocinas: Sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Tecnología en Marcha* 21(2), 9-16.
- Romalde, J., Ravelo, C., Lopez-Romalde, S., Avendano-Herrera, R., Magariños, B., Toranzo, A. 2005. Vaccination strategies to prevent important emerging diseases for spanish aquaculture. En: *Progress in fish vaccinology* 121, 85-95.
- Ronda, C., Vázquez, M., López, R. 2003. Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en Acuicultura. *Revista AquaTic* 18, 3-10.
- Ruíz-Ponte, C., Samain, J., Sánchez, J., Nicolas, J. 1999. The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. *Marine Biotechnology* 1, 52-59.
- Saénz de Rodrigañez, M.A., Díaz-Rosales, P., Chabrilón, M., Smidt, H., Arijo, S., León-Rubio, J., Alarcón, F., Balebona, M., Moriñigo, M., Cara, J., Moyano, F. 2009. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquacultura Nutrition* 15, 177-185.
- Sahoo, P., Mukherjee, K. 2002. The effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*). *Fish & Shellfish Immunology* 12, 1-16.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63-92.
- Sakakura, Y., Koshio, S., Iida, T., Tsukamoto, K., Kida, T., Blom, J. H. 1998. Dietary vitamin C improves the quality of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) seedlings. *Aquaculture* 161, 427-436.

- Sako, H. 1993. Acquired immunity of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, recovered from experimental infection with beta-hemolytic *Streptococcus* sp. *Suisanzoshoku* 40, 389-392.
- Salinas, I., Abelli, L., Bertoni, F., Picchiatti, S., Roque, A., Furones, D., Cuesta A., Meseguer, J., Esteban, M. 2008. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 25(1-2), 114-123.
- Salminen, S., Gueimonde, M. Isolauri, E. 2005. Probiotics that modify disease risk. *Journal of Nutrition* 135, 1294-1298.
- Salminen, S., Isolauri, E., Salminen, E. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: Successful strains for future challenge. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 347-358.
- Sánchez, A., Nabil, B., Hikmate, A., Martínez, M., Gálvez, A. 2010. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiology* 27, 955-961.
- Schroers, V., Van Der Marel, M., Steinhagen, D. 2008. Influence of carp intestinal mucus molecular size and glycosylation on bacterial adhesion. *Diseases of Aquatic Organisms* 81, 135-142.
- Schwyn, B., Neiland, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160, 47-56.
- Sealey, W., Barrows, F., Hang, A., Johansen, K., Overturf, K. 2008. Evaluation of the ability of barley genotypes containing different amounts of β -glucan to alter growth and disease resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Animal Feed Science and Technology* 141 (1-2), 115-128.

- Seljestokken, B., Bergh, Ø., Melingen, G., Rudra, H., Hetlelid Olsen, R., Samuelsen, O. 2006. Treating experimentally induced vibriosis (*Listonella anguillarum*) in cod (*Gadus morhua* L.) with florfenicol. *Journal of Fish Diseases* 29, 737-742.
- Sequeiros, C., Vallejo, M., Marquet, R., Olivera, M. 2010. Inhibitory activity against the fish pathogen *Lactococcus garvieae* produced by *Lactococcus lactis* TW34, a lactic acid bacterium isolated from the intestinal tract of a Patagonian fish. *Archives in Microbiology* 192 (4), 237-245.
- Servin, A., Coconnier, M. 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17(5), 741-754.
- Sharifuzzaman S., Austin B. 2010. Development of protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Vibrio anguillarum* following use of the probiotic *Kocuria* SM1. *Fish & Shellfish Immunology* 29, 212-216.
- Sharifuzzaman, S., Austin, B. 2009. Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology* 27, 440-445.
- Shewmaker, P., Steigerwalt, A., Morey, R., Carvalho, G., Elliott, J., Joyce, K., Barret, T., Teixeira, M., Facklam, R. 2004. *Vagococcus carniphilus* sp. nov., isolated from ground beef. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 54, 1505-1510.
- Shiffrin, E., Blum, S. 2002. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *European Journal of Clinical Nutrition* 56 (3), 60-64.
- Shiri-Harzevili, A.R., Van Duffel, H., Dhert, P., Swings, J., Sorgeloos, P. 1998. Use of a potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). *Aquaculture Research* 29, 411-417.

- Silva, F., Brito, M., Farias, L., Nicoli, F. 2005. Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz. *Journal of Fish Biology* 67 (6), 1686-1698.
- Sinderman, C. 1990. Principal diseases of marine fish and shellfish. Second edition (Vol. 1). Academic Press USA, 521.
- Smibert, R., Krieg, N. 1981. Systematics: General caracterización. Manual of Methods for General bacteriology. American Society for Microbiology, Washington. D.C. 409-443.
- Smith, P., David, S. 1993. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Fish diseases* 16, 521-524.
- Sommerset, I., Skern, R., Biering, E., Bleie, H., Fiksdal, I., Grove, S., y Nerland, A. 2005. Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunology* 18 (1), 13-29.
- Son, V., Chang, Ch., Wu, M., Guu, Y., Chiu, Ch., Cheng, W. 2009. Dietary administration of the probiotic *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology* 26, 691-698.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Sick, E.B., Pipper, C.B., Martinussen, T., Slierendrecht, W.J., Gram, L. 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environmental Microbiology* 3 (12), 755-765.
- Sperti, C.S., 1971. Probiotics. Avi Publishing Co, West Point, Connecticut 68-83.

- Staykov, Y., Spring, P., Denev, S., Sweetman, J. 2007. Effect of mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International* 15, 153-161.
- Strout, R., Sawyer, E., Countermash B. 1978. Pathogenic vibriosis in confinementreared and feral fishes of the Maine-New Hampshire coas. *Journal Fish Research. Board of Canada* 35, 403-488.
- Sugita, H., Chihiro, M., Yoshiaki, D. 1990. The vitamin B₁₂-producing ability of intestinal bacteria isolated from tilapia and channel catfish. *Nippon Suisan Gakk* 56, 701-710.
- Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N., Deguchi., Y. 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture* 165 (3-4), 269-280.
- Sugita, H., Matsou, N., Shibuya, K., Deguchi, Y. 1991. The vitamin B₁₂ producing ability of the intestinal microflora os freshwater fish. *Aquaculture* 92, 267-276.
- Sullivan, D. 2001. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 49, 1751-1760.
- Suminto-Hirayama, K. 1996. Effects of bacterial coexistence on the growth of a marine diatom *Chaetoceros gracilis*. *Fisheries Science* 62 (1), 40-43.
- Suminto-Hirayama, K. 1997. Application of a growth-promoting bacteria for stable mass culture of three marine microalgae. *Hydrobiologia* 358, 223-230.
- Sun, Y., Yang, H., Ru-Long, Ma., Wen-Yan, Lin. 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology* 29, 803-809.

- Suzer, C., Deniz Çoban, D., Kamaci, H., Saka, S., Firat, K., Otgucuoğlu, O., Küçüksarı, H. 2008. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 280 (1-4) 140-145.
- Tapia-Paniagua, S., Chabrilón, M., Díaz-Rosales, P., De la Banda, I., Lobo C, Balebona, MC., Moriñigo, MA. 2010. Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbiology Ecology* 60 (2), 310-319.
- Ten Brink, B., Minekus, M., Bol, J., Huis-Veld., J. 1987. Production of antibacterial compounds by *Lactobacilli*. *FEMS Microbiololgy Review* 46-64.
- Thompson, F., Iida, T., Swings, J. 2004. Biodiversity of *Vibrio*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 403-431.
- Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penades, J.R. Lasa, I. 2001. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied Environment Microbiology* 67, 4538-4545.
- Tolmasky, M., Actis L., Toranzo, A., Barja, J., Crosa HJ. 1985. Plasmids medianting iron uptake in *Vibrio anguillarum* strains isolated from turbot in Spain. *Journal General Microbiology* 131, 1989-1997.
- Toranzo, A. Barja, J., 1990. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* 9, 73-82.
- Toranzo, A., Barja, J. 1993. Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Annual Review of Fish Diseases* 3, 5-36.
- Toranzo, A., Magarinos, B., Romalde, J. 2005. A Review of the main bacterial fish diseases in mariculture system. *Aquaculture* 246, 37-61.

- Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M. J., Montero, D., Robaina, L., Real, F., Sweetman, J., Tort, L., Izquierdo, M.S. 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish & Shellfish Immunology* 23, 969-981.
- Torrent, A., Déniz, S., Ruiz, A., Calabuig, P., Sicilia, J., Orós J. 2002. Esophageal Diverticulum Associated with *Aerococcus viridians* Infection in a Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta*). *Journal of Wildlife Diseases* 38(1), 221-223.
- Torres, V. 1999. Flora Intestinal, Probióticos y Salud. Ed. Gráfica Nueva. México.
- Tovar, D., Mazurais, D., Gatesoupe, J., Quazuguel, P., Cahu, C., Zambonino-Infante, J. 2010. Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 300 (1-4), 142-147.
- Tovar, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vazquez-Juárez, J. Lesel, R. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 204(1-2), 113-123.
- Tovar, D., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vazquez-Juarez, R. 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture* 234, 415-427.
- Tseng, D., Ho, P., Huang, S., Cheng, Sh., Shiu, Y., Chiu, Ch., Liu, Ch. 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish & Shellfish Immunology* 26, 339-344.
- Underdown, B. 1986. Immunoglobulin A. *Annual Review Immunology* 4, 389-417.
- Vadillo-Rodríguez, V., Busscher, H., van der Mei, H., de Vries, J., Norde, W. 2005. Role of lactobacillus cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces* 41 (1), 33-41.

- Vallejo, M., Marguet, E., Etchechoury, V. 2008. Características de α -acetolactato sintetasa y producción de diacetilo por *Enterococcus faecium* ETw7 y *Enterococcus faecalis* ETw23. *Revista Perú de Biología*. 15(1), 97-100.
- Van der Marel, M., Schroers, V., Neuhaus, H., Steinhagen, D. 2008. Chemotaxis towards, adhesion to, and growth in carp gut mucus of two *Aeromonas hydrophila* strains with different pathogenicity for common carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases* 31(5), 321-30.
- Varela, L., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Arijó, S., León-Rubio, M., García-Millán, I., Martín del Río, M., Moriñigo, M., Mancera, J. 2010. Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream *Sparus auratus*. *Aquaculture* 309, 265-271.
- Vaseeharan, B., Lin, J., Ramasamy, P. 2004. Effect of probiotics, antibiotic sensitivity, pathogenicity, and plasmid profiles of *Listonella anguillarum* like bacteria isolated from *Penaeus monodon* culture systems. *Aquaculture* 241, 77-91.
- Vázquez, J., Docosal, S., Mirón, J., González, M., Murado, A. 2005b. Proteases production by two vibrio species on residual marine media. *Journal Industrial of Microbiology Biotechnology* 33, 661-668.
- Vázquez, J., González, M., Murado, M. 2005a. Effect of lactic acid bacteria cultures on pathogens microbiota from fish. *Aquaculture* 245, 149-161.
- Vázquez-Juárez, R., Andlid, T., Gustafsson, L. 1994. Cell surface hidrofobicity and its relation to adhesion of yeasts isolated from fish gut. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces* 2(1-3), 199-208.
- Vendrell, D., Balcázar, J., Calvo, A., de Blas I., Ruiz-Zarzuela, I., Gironés, O., Múzquiz, J. 2009. Quantitative analysis of bacterial adhesion to fish tissue. *Colloids Surf B Biointerfaces* 71 (2), 331-333.

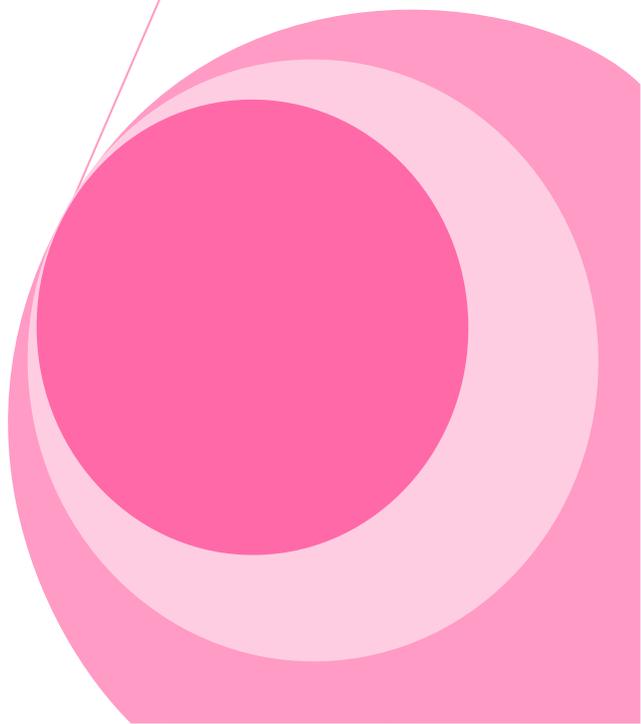
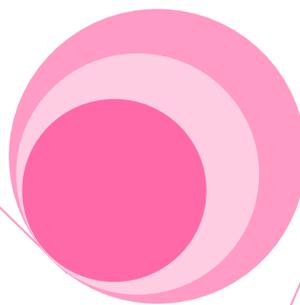
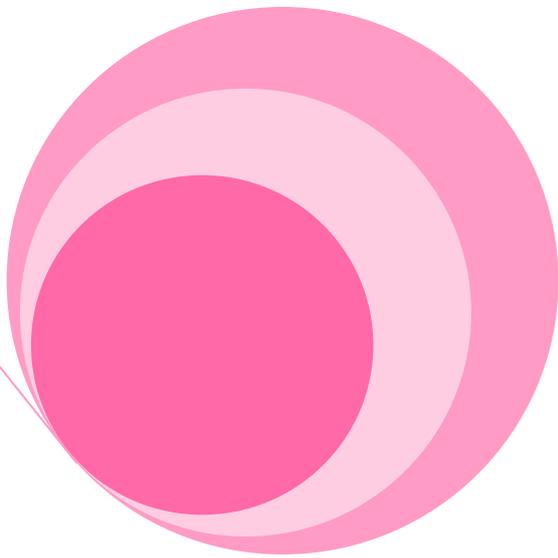
- Vendrell, D., Balcázar, J., de Blas I., Ruiz-Zarzuela, I., Gironés O., Múzquiz J. 2007. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comparative Immunology Microbiology Infect Diseases* 31(4), 337-345.
- Venkat, H.K., Sahu, N.P., Jain, K. 2004. Effect of feeding *Lactobacillus* based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research* 35, 501-507.
- Verschuere, L., Heang, H., Criel, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000b. Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (3), 1139-1146.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Huys, G., Dhont, J., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 1999. Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2527-2533.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000a. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review* 64, 655-671.
- Villamil, L., Figueras, A., Planas, M., Novoa, B. 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture* 219, 43-56.
- Vincent, S., Minkler, P., Binczewski, B., Etter, L., Shlaes, D. 1992. Vancomycin resistance in *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1392-1399.
- Vine, N., Leukes, D., Kaiser, H. 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Review* 30 (3), 404-427.
- Vine, N., Leukes, W., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J., Hecht, T. 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases* 27, 319-326.

- Wang, S., Lauritz, J., Jass, J., Milton, D. 2003. Role for the major outer membrane protein from *Vibrio anguillarum* in bile resistance and biofilm formation. *Microbiology* 149, 1061-71.
- Wang, W., Chi, Z., Chi, Z., Li, J., Wang, X. 2009. Siderophore production by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* and its antimicrobial activity. *Bioresource Technology* 100, 2639-2641.
- Wang, X., Wang, Q., Xiao, J., Liu, Q., Wu, H., Zhang, Y. 2010. Hemolysin *EthA* in *Edwardsiella tarda* is essential for fish invasion *in vivo* and *in vitro* and regulated by two-component system EsrA- EsrB and nucleoid protein HhaEt. *Fish & Shellfish Immunology* 29, 1082-1091.
- Wang, Y., Han, J. 2007. The role of probiotic cell wall hydrophobicity in bioremediation of aquaculture. *Aquaculture* 269, 349-354.
- Wang, Y., Li, J., Lin, J. 2008b. Probiotic in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture* 281, 1-4.
- Wang, Y., Tian, Z., Yao Z., Wei-fen, L. 2008a. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture* 3-4, 203-200.
- Wang, Zhiguo, Han, Xuemei, 2004. How to adjust water quality by using microorganism. *Ningxia Journal Agriculture Forestry Science Technology* 6, 60.
- Ward, J., Lum, M., Hall, D. 1986. Invasive *Haemophilus influenzae* type b disease in Alaska: Background epidemiology for a vaccine efficacy trial. *Journal of Infection Disease* 153, 17-26.
- Wen, Z., Burne, R. 2002. Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1196-1203.

- Westerdahl, A., Olsson, J., Kjelleberg, S., Cownway, P. 1991. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2223-2228.
- Whittington, R., Lim, Ch., Klesius, H. 2005. Effect of dietary β -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 248 (1-4), 217-225.
www.fao.org/docrep/005/y7300s/y7300s06a.htm
- Yano, T., Mangindaan, P., Matsuyama, H. 1989. Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some β -1,3-glucans. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55, 1815-1819.
- Yeh, Sh., Chang, Ch., Chi-Yao Chang, Chi., Chun-Hung Liu, Ch., Cheng, W. 2008. Dietary sodium alginate administration affects fingerling growth and resistance to *Streptococcus* sp. and iridovirus, and juvenile non-specific immune responses of the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology* 25, (1-2), 19-27.
- Zhang, Q., Hongming, M., Mai, K., Zhang, W., Liufu Z., Xu, W. 2010. Interaction of dietary *Bacillus subtilis* and fructo-oligo saccharide on the growth performance, non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicas*. *Aquaculture* 29 (2), 204-211.
- Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y., Li, W. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 287 (3-4), 349-353.
- Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y., Li, W. 2010. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiology Biochemistry* 36 (3), 501-509.

- Zlotkin, A., Chilmonczyk, SD., Eynogor, M., Hurvitz, A., Ghittino, C., Eldar, A. 1998.
Trojan horse effect: fagocyte- mediated *Streptococcus iniae* infection of fish.
Infection and Immunity 71, 2318-2325.

X-ANEXOS



ANEXO I

Medios de cultivo

Caldo infusión Cerebro Corazón (BHIB)

Composición (por litro):

Infusión de cerebro de ternera	7,5g
Infusión de corazón de res	10g
Dextrosa	2g
Peptona de gelatina	10g
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄)	2,5g
Cloruro sódico (NaCl)	5g

Ajustar pH final a $7,4 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación: Suspender 37 g en 1 litro de agua destilada, calentar y agitar hasta disolución completa. Esterilizar a 121°C durante 15-20 minutos. Agitar el medio antes de servir. Dejar enfriar hasta 45°C y distribuir en placas Petri estériles con 15 ml en cada una.

Agar Infusión Cerebro Corazón (BHIA)

Composición (por litro):

Infusión de cerebro de ternera	7,5g
Infusión de corazón de res	7,5g
Dextrosa	2g
Mezcla de peptonas	10g
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄)	2,5g
Cloruro sódico (NaCl)	5g
Agar	15g

Ajustar pH final a $7,4 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación: Suspender 52 g en 1 litro de agua destilada, calentar y agitar hasta disolución completa. Esterilizar a 121°C durante 15-20 minutos. Agitar el medio antes de servir. Dejar enfriar hasta 45°C y distribuir en placas Petri estériles con 15 ml en cada una.

ANEXO I

Medios de cultivo

Caldo Trypticase de Soja (TSB)

Composición por litro:

Digerido pancreático de caseína	17g
Digerido papaínico de soja	3g
Fosfato dipotásico	2,5g
Glucosa monohidrato	2,5g
Cloruro sódico	5g

Ajustar pH final a $7,3 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación: Suspender 30 g en 1 litro de agua destilada, calentar y agitar hasta disolución completa. Esterilizar a 121°C durante 15-20 minutos. Agitar el medio antes de servir. Dejar enfriar hasta 45°C y distribuir en placas Petri estériles con 15 ml en cada una.

Nota: El TSB semisólido se prepara de la misma manera pero se adicionan 8g de agar bacteriológico.

Tripticaseina Soja Agar (TSA)

Composición por litro:

Digerido pancreático de caseína	15g
Digerido papaínico de soja	5g
Cloruro sódico	5g
Agar bacteriológico	15g

Ajustar pH final a $7,3 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación: Suspender 40 g en 1 litro de agua destilada, calentar y agitar hasta disolución completa. Esterilizar a 121°C durante 15-20 minutos. Agitar el medio antes de servir. Dejar enfriar hasta 45°C y distribuir en placas Petri estériles con 15 ml en cada una.

ANEXO I

Medios de cultivo

Agar TCBS

Composición por litro:

Sacarosa	20g
Citrato de sodio	10g
Tiosulfato de sodio	10g
Cloruro de sodio	10g
Extracto de levadura	5g
Peptona de caseína	5g
Peptona de carne	5g
Bilis de buey	5g
Colato de sodio	3g
Citrato férrico	1g
Azul de timol	0,04g
Azul de bromotimol	0,04g
Agar bacteriológico	14g

Ajustar pH final a $8,6 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación: Suspender 88 g en 1 litro de agua destilada. Mezclar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando fuertemente. Hervir durante 1 minuto o hasta disolución completa. Enfriar a $45-50^{\circ}\text{C}$ y vaciar en placas de Petri estériles.

Base de Agar Sangre

Composición por litro:

Infusión de Músculo de Corazón	2,0 g
Extracto de Levadura	5,0 g
Cloruro de Sodio	5,0 g
Agar Bacteriológico	15 g
Digerido Pancreático de Caseína	13 g

Ajustar pH final a $7,3 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación: Suspender 40 g de medio en un litro de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C . Cuando el medio alcance una temperatura entre $45-50^{\circ}\text{C}$, añadir un 5% de sangre de oveja desfibrinada, homogeneizar y servir en placas de Petri estériles.

ANEXO I

Medios de cultivo

Man Rogosa y Sharpe Agar

Composición por litro:

Mezclas de peptona	18g
Extracto de levadura	4g
Glucosa	20g
Tween 80	1ml
Fosfato dipotasio de hidrógeno	2g
Citrato triamonio	2g
Acetato de sodio anhidro	3g
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0,2g
Sulfato de magnesio anhidro	0,034g
Agar	12g

Ajustar pH final a $6,2 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación: Suspender 34 g en 1 litro de agua destilada, calentar y agitar hasta disolución completa. Esterilizar a 121°C durante 15-20 minutos. Agitar el medio antes de servir. Dejar enfriar hasta 45°C y distribuir en placas Petri estériles con 15 ml en cada una.

Medio base de salinidad

Composición por litro:

Peptona bacteriológica	4g
Extracto de levadura	1g
Agar	15g
Cloruro de sodio	% deseado

Ajustar pH final a $7 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación: Suspender todos los ingredientes en 1 litro de agua destilada, calentar y agitar hasta disolución completa. Esterilizar a 121°C durante 15-20 minutos. Agitar el medio antes de servir. Dejar enfriar hasta 45°C y distribuir en placas Petri estériles con 15 ml en cada una.

ANEXO I

Medios de cultivo

Agar Marino

Composición por litro:

Cloruro de sodio	19,40g
Bromuro potásico	0,08g
Cloruro de magnesio	8,80g
Cloruro de estroncio	0,034g
Peptona Bacteriológica	5,00g
Ácido bórico	0,022g
Sulfato de sodio	3,24g
Fosfato di sódico	0,008g
Cloruro de calcio	1,80g
Silicato de sodio	0,004g
Extracto de levadura	1,00g
Fluoruro de sodio	0,0024g
Cloruro de potasio	0,55g
Nitrato de amonio	0,0016g
Bicarbonato sódico	0,16g
Agar	15g
Citrato férrico	0,10g

Ajustar pH final a $7,6 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación: Suspender 55,2 g en 1 litro de agua destilada, calentar y agitar hasta disolución completa. Esterilizar a 121°C durante 15-20 minutos. Agitar el medio antes de servir. Dejar enfriar hasta 45°C y distribuir en placas Petri estériles con 15 ml en cada una.

ANEXO II

Otros medios y soluciones

Medio CAS para la detección de sideróforos

Agua destilada	750 ml	
NaOH	6 g	
PIPES	30,24 g	
MM9 x 10	100 ml	

<u>Composición del medio MM9 x 10</u>	
KH ₂ PO ₄	3 g
NH ₄ Cl	5 g
Agua destilada	1 litro

Autoclavar y dejar enfriar hasta 50°C para posteriormente añadir:

Ácidos casamínos	30ml
Glucosa al 20%	10ml
1M MgCl ₂	1ml
100 mM CaCl ₂	1ml
CAS-HDTMA	100ml

Ajustar pH final a $6,8 \pm 0,2$ a 25°C

Tampón Fosfato Salino (PBS)

Composición por litro

Dihidrogenofosfato potásico (KH ₂ PO ₄ ; 1,4 mM)	0,24 g
Cloruro potásico (KCl; 2,7 mM)	0,20 g
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄ ; 0,01M)	1,44 g
Cloruro sódico (NaCl; 0,137 M)	8 g

Preparación: Mezclar todos los ingredientes en 1 litro agua destilada, agitar hasta que todos los ingredientes estén disueltos. Esterilizar a 121°C durante 30 minutos.

ANEXO II

Otros medios y soluciones

Soluciones para la determinación del mucus fijado

Solución Buffer

0,01 mol/l PBS, pH 7,2

Solución tapizado

NaHCO ₃	8,4 g
NaCO ₃	10,6 g
Agua destilada 500ml (pH 9,6)	

Solución de lavado

Solución buffer adicionado con Tween 20 al 0,1%

Solución sustrato

Agua destilada	12 ml
Dako-OPD	4 tabletas
Agua oxigenada 30 %	5 µl

Solución Stop

0,5 mol/ml H₂SO₄ al 95 %

Solución conjugada

PBS	12 ml
Estreptavidina- HRP	6 µl (Dilución 1:2000)

Solución bloqueadora

100 ml de agua destilada adicionado con 1g de Albúmina Sérica Bovina (ASB)

Controles

0,002 mg BSA / ml en PBS como control negativo

0,002 mg mucus de estómago de porcino (sigma) /ml PBS como control positivo

Lectina DBA

Marcada con biotina 1:1000 en solución PBS

ANEXO II

Otros medios y soluciones

TAE 50X

Composición por litro:

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
Na ₂ EDTA	100 ml

Ajustar pH final a $8 \pm 0,2$ a 25°C

Nota: Se mezclan todos los ingredientes hasta que estén todos disueltos, se ajusta el pH y a partir de este concentrado preparamos la solución 1X, necesaria para la electroforesis.

TE 1X

Composición por litro:

10 ml de Tris-HCl (pH 8) 1M
2 ml EDTA (pH 8) 0,5 M
988 ml de agua destilada

Dodecilsulfato sódico (SDS) 1%

Composición por litro

10 g dodecilsulfato sódico en 1000 ml de agua destilada.

ANEXO III

Casas comerciales empleadas

BioMar	BioMar Iberia, S.A., Dueñas, España.
BioMérieux	Biomerieux España S.A., Manuel Tovar Nº 45, Madrid.
Invitrogen	Invitrogen, S.A. Parque Mas Blau, Prat Llobregat, Barcelona España.
Oxoid	Oxoid Limited, Wade Road Basingstoke Hampshire RG24 8PW, UK.
Promega	Promega Biotech Iberica S.L., Alcobendas - Madrid, España.
Pronadisa	Laboratorios Conda, Torrejón de Ardóz, Madrid, España.
Sigma	Sigma-Aldrich Química, S.A. Cojóbar, Burgos, España.

The page features a decorative graphic consisting of three overlapping circles in shades of pink, arranged in a diagonal line from the top right towards the bottom right. Two thin pink lines intersect at the top left, forming a large 'V' shape that frames the circles. The text is centered in the lower-left quadrant.

II-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



XI-PUBLICACIONES

DE LA TESIS EN

REVISTAS JCR



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*

L. Sorroza, D. Padilla*, F. Acosta, L. Román, V. Grasso, J. Vega, F. Real

University Institute of Animal Health (IUSA), University of las Palmas de Gran Canaria, 35413 Arucas, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 April 2011

Received in revised form 9 August 2011

Accepted 8 September 2011

Keywords:

Vagococcus fluvialis

Probiotics

Sea bass

Vibriosis

Adhesion

ABSTRACT

Aquaculture is one of the main sources of income in many countries worldwide. Intensive farms are often affected by different infectious diseases that can decrease their final production. To control this situation, several antibiotics are frequently used with known environmental consequences. The aim of this study was to analyze different bacterial strains isolated from gilthead sea bream, sea bass, sole and meagre guts, for use as probiotics in aquaculture. The strains were evaluated *in vitro* through various mechanisms of selection, such as the production of antagonistic effects against pathogens, production of antibacterial substance, adhesion to the intestinal mucus, competition for nutrients or binding site, and growth in intestinal mucus. A total of 50 bacterial strains were analyzed and only one showed excellent *in vitro* results for consideration as a candidate to be analyzed *in vivo*. The strain, identified as *Vagococcus fluvialis*, showed good protection against *Vibrio anguillarum* 975-1 *in vivo* in the experimental challenge, showing a relative percent survival of 42.3% higher than positive control group. Therefore, in conclusion we consider this strain to be a good candidate for use as a future probiotic in aquaculture.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The aquaculture industry has been rapidly developing worldwide in the last 30 years. Europe has produced high quality products by developing efficient technology. In southern Europe, the culture of sea bass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sole (*Solea solea*) are of great importance, while the culture of the meagre (*Argyrosomus regius*) has been introduced in recent years. The presence of infectious diseases is inevitable due to the intensive culture conditions, which results in huge economic losses in this sector. Outbreaks of *Vibrio*

anguillarum cause acute hemorrhagic septicemia and current control strategies are based on vaccination and chemotherapy (Austin and Austin, 2007).

The use of antibiotics is a very common practice on fish farms, but the negative effects on environmental and public health make it necessary to develop new strategies to control infectious diseases. Due to this reason, the European Union placed restrictions on antibiotic use in aquaculture and to solve this problem, research has been focused in the last decades on alternative environmentally friendly methods to control disease. Most probiotics used in aquaculture are lactic acid bacteria or bacterial strains that belong to the genus *Vibrio*, *Bacillus* and *Pseudomonas* (Balcázar et al., 2007). These have been tested in food or added to water, and the most studied aspect has been on the improvement in animal health (Gateusope, 1999).

* Corresponding author. Tel.: +34 928 459741; fax: +34 928 451142.
E-mail address: dpadilla@dpat.ulpgc.es (D. Padilla).

To date, a wide range of these bacteria have been proposed for their application as probiotics (Kesarcodi-Watson et al., 2008). However, the search for new microorganisms continues. In this respect, we isolated and evaluated different strains from the gut of different fish species for possible use as probiotics in aquaculture.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

A total of 80 cultured gilthead sea bream (*S. aurata*), 60 sea bass (*D. labrax*), 25 sole (*S. solea*) and 30 meagre (*A. regius*), all of different average body weight, were anaesthetized in clove oil and sacrificed in liquid ice to extract the gut. One-gram amounts (wet weight) of the gut content of each fish were homogenized in 9 ml PBS and serial dilutions were spread on marine agar (MA), brain heart infusion agar (BHIA), blood agar base (BAB), trypticase soy agar (TSA) and De Man Rogosa and Sharpe broth (MRS) for 48 h at 25 °C to get as many bacteria as possible, which were stored frozen at –80 °C in BHIB with 15% glycerol.

2.2. Antagonistic effect and production of antibacterial substances of probiotics against pathogens

The production of antagonistic effect was analyzed using several known pathogens of marine and continental aquaculture (Table 1) following the method described by Austin et al. (1992). Briefly, 100 µl of different pathogen were spread on TSA and each isolate was put into the inoculum. Inoculated plates were incubated at 25 °C for 24–48 h and we observed the inhibition halo.

In order to determine the production of antibacterial substances in bacterial supernatants we followed the method described by Nikoskelainen et al. (2001) with modifications (Kim and Austin, 2008). Potential probiotic strains were grown in BHIB for 24 h at 22 °C, centrifuged at 2000 × g and the supernatants sterilized through 0.45 µm-pore-size filters, and lyophilized using a freeze dryer (Telstar, Cryodos-50) for 24 h. The freeze-dried supernatant was re-suspended in 100 µl of PBS (10 times concentrated) to be challenged against selected fish

pathogen (*V. anguillarum* 975-1). The pathogen were grown in 1 ml of BHIB overnight at 22 °C and transferred evenly onto TSA plates. 10 µl of lyophilized sample was added to each well, made with sterile Pasteur pipette, and the inhibition zone was observed after incubation for 24 h.

2.3. Identification of selected strains

The strains that showed antagonistic effect were identified by 16S rRNA gene partial sequencing by BLAST analysis (Altschul et al., 1990). DNA was extracted from bacterial cultures with Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. PCR by 16S rRNA gene partial sequencing was carried out using a MyCycler thermal cycler (Biorad) with universal primers *PLB* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and *MLB* (5'-GGCTGCTGGCACGTAGTTAG-3') (Hébert et al., 2000).

2.4. Growth inhibition by co-culture

Overnight culture of potential probiotic strain and fish pathogen *V. anguillarum* 975-1 strain were washed twice with PBS and cell concentrations were adjusted to an absorbance of 0.5 at 600 nm (Nikoskelainen et al., 2001). Then, 100 µl of the strains were mixed in 1 ml of trypticase soy broth (TSB) and incubated for 48 h at 22 °C. After incubation, the numbers of cells in each sample were determined by serial dilution in PBS and plated on TSA and thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS).

2.5. Fish bile and pH resistance

A 100 µl aliquot of fresh bile from sea bass was added to 900 µl of strain tested at 10⁷ CFU ml⁻¹. 100 µl of same concentrations of strain tested was added to 900 µl PBS with a pH range 3–7, samples were incubated 1.5 h at 22 °C and serially diluted in PBS and determined by plate counting on TSA (Nikoskelainen et al., 2001).

2.6. Adhesion mucus assays

Intestinal mucus was isolated from healthy sea bass. Fish with 400 g of average body weight were starved for 48 h and gut removed and homogenized in PBS. All mucus preparations were centrifuged twice at 12,000 × g for 5 min at 4 °C to remove particulate and cellular material (Balcázar et al., 2007). Then, the solutions were adjusted to 0.5–1 mg ml⁻¹ protein in PBS by Bradford Protein Assay Kit (Sigma), sterilized by UV light exposure for 30 min and stored at –20 °C until use. Binding of mucus to plate was confirmed by a lectin-binding assay using ConA (Van der Marel et al., 2008).

The percentage of adhesion to intestinal mucus was evaluated following the methodology described by Van der Marel et al. (2008). Briefly, the mucus was prepared as described above and the probiotic strain was stained with 2 µl per 10⁹ CFU of green fluorescent nucleic acid (SYTO 9) (Invitrogen). 25 µl of each sample was added to 96-well black polystyrene plates (Nunc) and 75 µl of coating buffer (16.8 g sodium hydrogen carbonate, 21.2 g sodium carbonate per litre, pH 9.6) to each well and incubated overnight

Table 1
Pathogens used in testing antagonistic effect.

Pathogen strains	References	Origin
<i>V. anguillarum</i> 4347	CECT	<i>Anguilla anguilla</i>
<i>V. anguillarum</i> 975-1	USC	<i>Psetta maxima</i>
<i>V. alginolyticus</i> 521	CECT	<i>Trachurus trachurus</i>
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> 94/99	IUSA	<i>Sparus aurata</i>
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> 17911	ATCC	<i>Perca fluviatilis</i>
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> DI-21	ATCC	<i>Sparus aurata</i>
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> C2	IUSA	<i>Sparus aurata</i>
<i>Yersinia ruckeri</i> 955	CECT	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
<i>Lactococcus garvieae</i> 102507	CIP	<i>Salmo trutta</i>
<i>Streptococcus iniae</i> 1	IUSA	<i>Pagrus pagrus</i>

CECT: Spanish Type Culture Collection; USC: Institute of Aquaculture, Santiago de Compostela University; ATCC: American Type Culture Collection; CIP: Collection Institute Pasteur; IUSA: University Institute of Animal Health.

at 4 °C. After washing with saline solution, 25 µl of 10⁹ CFU ml⁻¹ of fluorescently labelled bacterial solution was added and then incubated for 30 min in the dark at room temperature. The plates were washed and 50 µl of saline solution was added to spectrophotometric measurements (485 nm excitation, 535 nm emissions). The adhesion was expressed as the percentage of fluorescence of the bound bacteria in relation to the fluorescence of the bacterial suspension added initially to the well.

The test of competitive exclusion was performed to analyze if the probiotic strain was able to compete with analyzed fish pathogen for binding sites. The strain selected (25 µl at 10⁹ CFU ml⁻¹) was placed with the immobilized mucus for 30 min and washed with saline solution. Then, 25 µl 10⁹ CFU ml⁻¹ of stained fish pathogen cells with SYTO 9 were added and incubated for 30 min in the dark at room temperature. Finally, the wells were washed and 50 µl of saline solution was added to the spectrophotometric measurements. The competitive exclusion rate was expressed as the ratio between the percentage of adherence of the pathogen with and without the probiotic strain stained with SYTO 9 (Van der Marel et al., 2008).

2.7. Growth in intestinal mucus

The intestinal mucus of each fish species was diluted in PBS to a final protein concentration of 0.5 mg ml⁻¹. 10 µl of an overnight culture of each strain tested was inoculated in 3 ml of diluted mucus and incubated at 22 °C in a shaking incubator. Samples with BHIB and PBS were included as negative controls. The growth rate of each strain in mucus, BHIB and PBS was measured by monitoring the optical density at 540 nm and serial dilutions on TSA (Olsson et al., 1992).

2.8. Harmlessness test

To determine the possible harmful effects of the probiotic strain in sea bass, 0.1 ml (10⁸ CFU ml⁻¹) was injected intraperitoneally into two separated groups of 20 sea bass with an average body weight of 10 g. A control group was injected with the same volume of PBS. Fish were monitored daily to detect any adverse clinical signs for 30 days after inoculation, and sacrificed with an overdose of clove oil and necropsied to evaluate any possible lesions in the internal organs by histopathology. Also, fish were analyzed by microbiological methods on BHIA from internal organs to determine the presence or absence of the inoculated strain.

2.9. Probiotic administration and fish challenge with *V. anguillarum* 975-1

For preparation of the experimental diet with the probiotic strain, selected bacteria were cultured in BHIB for 24 h at 25 °C following the method by Irianto and Austin (2002). Briefly, the strain was centrifuged at 2500 × g for 20 min at 4 °C, and cell pellet was washed twice and re-suspended in saline solution to 10¹⁰ CFU ml⁻¹ by plate count on TSA. 25 ml of this selected strain were spread on

120 g of commercial feed (BioMar YM 558; Dueñas, Spain), mixed and dried for 24 h at 37 °C, to obtain a final concentration of 10⁹ CFU per gram of the commercial feed. The viability of the probiotic strain in feed was assessed by colony counts on TSA following storage of the diet at room temperature for 3 weeks.

For challenge, sea bass with an average body weight of 18 g were maintained with a close-water system at 20 °C with continued aeration and a photoperiod of 12 h. Fish were fed daily with 2% of body weight, and their health was checked upon arrival and during the 15 days of acclimatization period before starting to feed with the experimental diet containing the probiotic strain selected. Fish were fed during 20 days with the experimental diet including the probiotic before the experimental challenge. The challenge was made in triplicate with 25 fish per tank. A negative control group (not fed with probiotic and not challenged with *V. anguillarum* 975-1), and a positive control group inoculated with the pathogen and never previously fed with probiotic, were also included. The described experiments complied with the European Union (86/609/EU), the Spanish Government and the University of Las Palmas de Gran Canaria (Spain) guidelines for the use of laboratory animals.

V. anguillarum 975-1 was passaged in sea bass three times before performing the challenge by the intraperitoneal injection route to activate the bacteria. Twenty days after feeding, the positive control and probiotic test groups were exposed to *V. anguillarum* 975-1 with 10⁸ CFU ml⁻¹ in a bath for 8 h. The water temperature was raised and maintained from 21 °C to 24 °C to increase the effect of the experimental infection. Fish were observed everyday during 20 days after exposure to *V. anguillarum*, and each moribund or dead fish was necropsied. Isolated bacteria from fish were biochemically identified and internal organs analyzed by histopathology.

2.10. Statistical analysis

The data were statistically analyzed by using Student's *t*-test. Statistical significance was set at two-tailed ($P < 0.05$), and were examined with SPSS statistics program for Windows, version 17.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). In the figures, numerical data and bars are shown as mean values with standard deviations. The survival curves were estimated by the Kaplan–Meier method and compared by long-rank test.

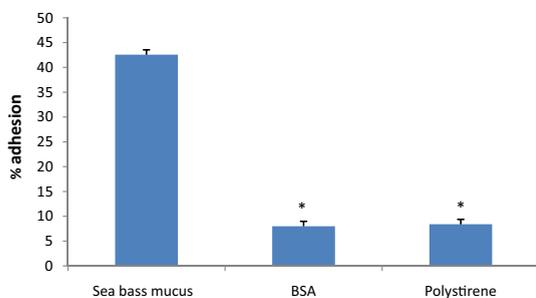
3. Results

50 bacterial strains were recovered from the guts of gilthead, sea bream, meagre, sea bass and sole, but only one strain from sole showed inhibitory effect against at least one of the pathogens tested. This strain showed inhibitory effect against *V. anguillarum* 4347 and 975-1, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 94/99, C2 and DI-21, and the strain *Yersinia ruckeri* 955. None of the analyzed strains showed inhibitory effects against *Streptococcus iniae*, *Vibrio alginolyticus* or *Lactococcus garvieae*. The strain that showed inhibitory effect was identified as *Vagococcus fluvialis*, showing a similarity of 1051/1056 base pair

(99.5%) with sequence NR-026489 (type strain M-29c) by BLAST analysis against the NCBI database. This strain produced a zone of inhibition around the well on TSA by well diffusion method, showing that the inhibitory effect was due to this strain producing antimicrobial substances in its metabolism. After a 48-h growth in co-culture, the selected strain inhibited 10% of the growth of *V. anguillarum*, but this decrease was not significant ($P < 0.05$). The strain showed 66.7% and 53.5% survival in 10% of sea bass bile and at pH <5, respectively.

In the adhesion assay, this strain showed better adhesion to intestinal mucus (42.56%) than to bovine serum albumin or polystyrene, with significant differences ($P < 0.05$) among the controls (Fig. 1). The strain adhered to BSA and polystyrene at similar percentages. In the competitive adhesion assay, the adhesion capacity of *V. anguillarum* to mucus was significantly reduced (54.54%) after the exposure of the intestinal mucus to the probiotic strain. Furthermore, the selected strain showed the ability to use the mucus as a sole nutrient source and grew significantly in the intestinal mucus of sea bass (2.4×10^7 CFU ml⁻¹) compared with the control (1.5×10^6 CFU ml⁻¹) in PBS.

Evaluation of possible harmful effects by fish challenge showed that the strain tested was harmless to sea bass since no mortality or damage in the internal organs were observed. Moreover, the inoculated strain was not recovered from internal organs. In the experimental challenge to evaluate the level of protection of this probiotic against infection by *V. anguillarum* in sea bass, the mortality observed was 30% in the positive control fish group, while this was reduced to 17.3% in the fish previously fed with the probiotic strain (Fig. 2), representing a relative percent of survival of 42.3%. Statistical analysis demonstrated a significant difference ($P < 0.05$) in the survival of fish among the different groups analyzed. The affected fish showed signs of acute hemorrhagic septicemia with exophthalmia, corneal opacity and ulcers. Mortalities were attributed to the inoculated pathogen since the inoculated microorganism was recovered from the internal organs of dead fish in pure culture.



* Denotes a statistically significant difference ($P < 0.05$) compared with sea bass mucus

Fig. 1. Adhesion of selected strain to intestinal mucus from sea bass, bovine serum albumin and polystyrene. All data are given as percentage of the absorbance measurements of fluorescent stained bacteria \pm SD. * Denotes a statistically significant difference ($P < 0.05$) compared with sea bass mucus.

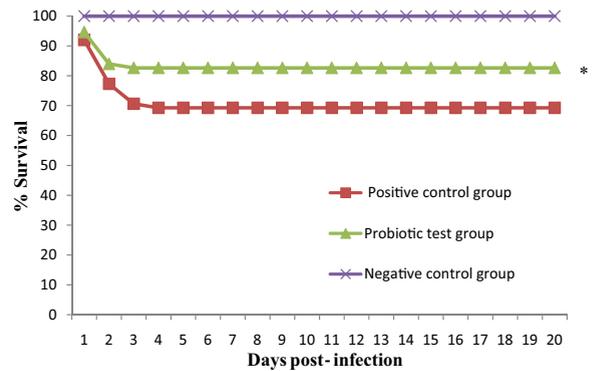


Fig. 2. Percentage of survival of sea bass previously fed with selected probiotic and challenged with *V. anguillarum*.

4. Discussion

The use of probiotics in aquaculture is a very recent development, but it has been used in terrestrial animals and humans for years, and must satisfy certain requirements before being used in aquaculture. *In vitro* tests to assess probiotic strains allowed us to determine whether these strains could be used for *in vivo* tests. The inhibitory activity against pathogens or competition for nutrient has been widely described and discussed (Kesarcodi-Watson et al., 2008), and it is an important criterion to select a probiotic candidate strain (Pan et al., 2008). In our study, only 1 out of the 50 isolated strains tested produced extracellular substances capable of inhibiting fish pathogens. Previous studies have suggested that inhibitory effects could be caused by volatile compound production of organic acid and bacteriocins (Balcázar et al., 2007). Our strain, identified as *V. fluvialis*, did not significantly reduce the growth of *V. anguillarum* after 24 h in co-culture, this mean it does not compete for nutrients, but this criterion is not necessary for the pre-selection of a good probiotic strain (Chabrilón et al., 2005).

In this study, we evaluated the effect of bile and pH as a prior step to adhesion, trying to simulate the passage of the bacteria through the gastrointestinal tract. The strain was affected by the bile, showing a survival of 66.7%, but we must bear in mind that this assay was carried out with a bile concentration of 10% since its real concentration in fish is unknown (Nikoskelainen et al., 2001), a much higher percentage than that used in the assays with humans (3%). We also observed a decrease in the survival of the strain in acid pH, but this does not mean that this strain is unable to survive and colonize the intestine because this does not occur *in vivo*. Bacteria will mix with food and the action of the acid pH will not be direct (Nikoskelainen et al., 2001). Also, tolerance to acidic conditions is not always a prerequisite for selecting a candidate probiotic aimed at marine larvae since their digestive system is alkaline during the live feed period (Hoehne-Reitan et al., 2001). The strain tested showed the ability to grow and adhere to the intestinal mucus of fish, and these results compared with those obtained in the adhesion to BSA and polystyrene, suggesting that the microbial adhesion process

may be due to passive forces, electrostatic interactions, steric forces, lipoteichoic acids and specific structures such as external appendages covered by lectins (Balcázar et al., 2007). This fact is considered as a very important property to enable colonization and persistence in the intestinal tract (Verschuere et al., 2000).

The strain tested also showed the ability to compete for attachment site with *V. anguillarum*. This fact is beneficial to the health of the fish due to the presence of probiotic bacteria that may restrict the access of pathogens to tissues receptors by steric hindrance or by blocking the receptor with specific adhesion analog (Tuomola et al., 1999). To date, it is generally accepted that lactic acid bacteria form part of the normal intestinal microbiota of fish from the first few days of life (Ringo et al., 2010). The genus *Vagococcus* belong to lactic acid bacteria and can be found in different environments, being part of the microbiota of several fish species, especially in freshwater fishes (González et al., 2000) although some species of these genera have been isolated from diseased fish (Michel et al., 2007). However, this strain was harmless in sea bass. There are no studies analyzing this genus as a probiotic, but in general, it is well documented that many lactic acid bacteria are harmless and some strains have been reported to have beneficial effects on fish health (Gatesoupe, 2008).

In fish, the three major routes of infection are the skin, gills and gastrointestinal tract. Therefore, in the experimental challenge, we observed that relative percent survival with *V. fluvialis* was 42.3%, respect control group (infected with *V. anguillarum* and not fed probiotic), without assessing the mode of action. However, many studies in recent years have shown that dietary administration of lactic acid bacteria may reduce the incidence of diseases or lessen the severity of outbreaks (Ringo et al., 2010).

It is generally accepted that probiotics block pathogenic bacterial effects by various mechanisms, enhancing barrier function and stimulating protective responses (Vanderpool et al., 2008).

5. Conclusion

In conclusion, our data show that the strain isolated from sole gut and identified as *V. fluvialis* could be used as probiotic bacteria to protect sea bass against infection by *V. anguillarum*, and may be an important management tool for the control of this disease in marine culture.

Conflict of interest

This research does not present conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors wish to thank CANEXMAR SL for providing the fish for this research. We also thank Dr. M. Aller for technical assistance. The present study was funded by the

Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información 2010 (Canary Government).

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Austin, B., Austin, D.A., 2007. *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish*, 4th (revised) ed. Springer-Praxis, Godalming.
- Austin, B., Baudet, E., Stobie, M., 1992. Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetrasetelmis suecica*. *J. Fish Dis.* 15, 55–61.
- Balcázar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Gironés, O., Múzquiz, J.L., 2007. In vitro adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria fish pathogens. *Vet. Microbiol.* 122, 373–380.
- Chabrilón, M., Rico, R.M., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., 2005. Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaoup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J. Fish Dis.* 28, 229–237.
- Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotic in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147–165.
- Gatesoupe, F.J., 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 14 (1–3), 107–114.
- González, C., Encinas, J., García-López, M., Otero, A., 2000. Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fish. *Food. Microbiol.* 17, 383–391.
- Hébert, E.M., Raya, R.R., Tailliez, P., De Giori, G.S., 2000. Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. *J. Food Microbiol.* 59, 19–27.
- Hoehne-Reitan, K., Kjårvik, E., Reitan, K.L., 2001. Development of the pH in the intestinal tract of larval turbot. *Mar. Biol.* 139, 1159–1164.
- Irianto, A., Austin, B., 2002. Use of probiotic to control furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Fish Dis.* 25, 333–342.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J., Gibson, L., 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274, 1–14.
- Kim, D.H., Austin, B., 2008. Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *J. Appl. Microbiol.* 47, 141–147.
- Michel, C.H., Pelletier, C., Boussaha, M., Douet, D., Lautraite, A., Tailliez, P., 2007. Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2947–2955.
- Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G., Ouwehand, A.C., 2001. Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2430–2435.
- Olsson, J.C., Westerdahl, A., Conway, P., Kjelleberg, S., 1992. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limanda limanda*)- associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 551–556.
- Pan, X., Wu, T., Zhang, L., Song, Z., Tang, H., Zhao, Z., 2008. In vitro evaluation on adherence and microbial properties of a candidate probiotic *Clostridium butyricum* CB2 for farmed fish. *Appl. Microbiol.* 105, 1623–1629.
- Ringo, E., Lovmo, L., Kristiansen, M., Bakken, I., Salinas, I., Myklebust, R., Olsen, R., Mayhew, T., 2010. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish. *Aquaculture Res. Rev.* 41, 451–467.
- Tuomola, E.M., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J., 1999. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 26, 137–142.
- Van der Marel, M., Schroers, V., Neuhaus, H., Steinhagen, D., 2008. Chemotaxis towards, adhesion to, and growth in carp gut mucus of two *Aeromonas hydrophila* strains with different pathogenicity for common carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Dis.* 31 (5), 321–330.
- Vanderpool, C., Yan, F., Polk, D., 2008. Mechanisms of probiotic action: implication for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 1585–1596.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 655–671.



XII- AGRADECIMIENTOS

Esta es otra parte muy importante en este documento, hay muchas personas a las que quiero hacer público mi agradecimiento, y espero no olvidarme de ninguna de ellas, así que empezamos:

Por supuesto al Dr. D. Fernando Real, Catedrático de Universidad y coordinador del Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, por su apoyo incondicional, por haber creído en mis posibilidades y por haberme proporcionado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, y que a pesar de todos los inconvenientes que se presentaron a lo largo de este camino, supo estar ahí para hacer posible este sueño. De todo corazón le estaré eternamente agradecida.

Gracias a mi otro Director, el Dr. D. Daniel Padilla por su confianza y dedicación.

Asimismo quiero agradecer a todas mis compañeras de laboratorio Jimena, Judith, Fátima, Valentina y por supuesto a mi entrañable Lore, que ha sido mi gran apoyo, tanto en los buenos como en los malos momentos, y no cabe duda que los extrañaré a todos.

También quiero extender mi agradecimiento a otros profesores que han participado en mi formación como el Dr. D. Félix Acosta, la Dra. Dña. Begoña Acosta, Dra. Dña. Ana Sofía Ramírez, Dra. Dña. María José Caballero, Dr. Gallardo, Dr. Santana del Pino, a mi querida Carmen Quintana, a Mercedes, Silvia, Tatiana, Orestes, a la gente del ICCM, a mi psicólogo favorito Nicolás, en fin a todos los amigos y conocidos, que directa o indirectamente han estado ahí apoyándome, y dándome ánimos en esta dura carrera.

Al Dr. Miguel Aller de la Universidad de León y al Dr. Salvador Arijo de la Universidad de Málaga, gracias por haber compartido sus experiencias en este trabajo.

Y por supuesto quiero dedicar este trabajo a mis grandes amores, Carmen, Penélope, Segundo y Elmer a quien le debo mi primer ordenador. Sin éste hubiese sido más difícil seguir estudiando. Y no puedo olvidarme de mi familia en Canarias, Cecilia, Carlos y de los pequeños Israel y José Carlos que durante todo este tiempo han estado ahí apoyándome en momentos difíciles, gracias familia los quiero mucho.

Y, finalmente, agradecerle a mi comadre y amiga Cecilia que junto a su esposo e hijos me hicieron sentir durante todo este tiempo como en casa. A pesar de la distancia, siempre los voy a llevar en mis recuerdos.

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1.- IMPORTANCIA DE LA ACUICULTURA

II.1.1.- La acuicultura en el mundo

El rápido crecimiento de la acuicultura en estas últimas cuatro décadas ha provocado que más de la mitad del pescado que se consume hoy en día proceda de esta industria. Dicha actividad, además de contribuir en la alimentación, también ha ayudado al desarrollo económico global.

Según datos de la Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2008), la acuicultura mundial produjo 73 millones de toneladas, frente a las aproximadamente 65 millones de toneladas procedentes de la pesca extractiva. En realidad, el volumen total de la pesca extractiva ascendió a 88,9 millones de toneladas, pero de ellas, casi 24 millones de toneladas se dedican a otros usos, principalmente piensos para ganadería terrestre, peces y crustáceos.

La producción global de la acuicultura ha crecido de manera importante, pasando de 0,6 millones de toneladas en 1950 a 73 millones de toneladas en 2009. Hasta 2007 se mantenía esta tendencia al alza, marcada en el último cuarto del siglo XX. Pero sin embargo, en estos últimos años es perceptible una ligera desaceleración en el ritmo de crecimiento de la acuicultura a nivel mundial, así como también un marcado estancamiento de esta actividad en la Unión Europea.

La acuicultura es una actividad que abarca muy variadas prácticas y una amplia gama de especies, sistemas y técnicas de producción. Puede definirse como el cultivo de organismos acuáticos con técnicas encaminadas a hacer más eficiente su producción y así contribuir con los esfuerzos para combatir el hambre y la malnutrición en los países en vías de desarrollo (APROMAR, 2011).

A nivel mundial, los países asiáticos son los mayores productores acuícolas, entre los cuales, China lidera la actividad pesquera a nivel mundial, así como también en productos procedentes de la acuicultura (Tabla I).

Tabla I.- Principales países productores de productos acuícolas, por toneladas anuales y tasa de variación interanual (APROMAR, 2011)

PAÍS	TONELADAS	% CRECIMIENTO ANUAL
República Popular de China	45.279.173	6,12
Indonesia	4.712.847	22,26
India	3.791.922	9,00
Vietnam	2.589.800	3,70
Filipinas	2.477.392	2,89
Tailandia	1.396.020	1,60
República de Corea	1.331.719	-4,52
Japón	1.243.336	4,68
Bangladesh	1.064.285	5,84
Noruega	961.840	10,45
Total de los principales países productores	64.848.334	6,76
Total resto de países	8.196.271	7,74
Total mundial	73.044.605	6,87
España (Ranking 19º país)	266.479	6,99

En volumen de producción, el alga laminaria japónica o wakame (*Undaria pinnatifida*), es la principal especie producida en el mundo con 4,9 millones de toneladas en 2009. La segunda especie es la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) con 4,1 millones de toneladas, pero en relación con el valor de la producción, el langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*) es la principal especie con 7.374 millones de euros, seguido por el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con un valor de 5.140 millones de euros (Tabla II).

El éxito de la acuicultura moderna se basa en el control sobre la reproducción de las especies, en el mejor conocimiento de su biología, en el control de las enfermedades, en las innovaciones tecnológicas y en el desarrollo de alimentos específicos. La acuicultura, a pesar de ser una actividad que se realiza prácticamente en todo el mundo, solo produce avances sustanciales en los países que apuestan verdaderamente por ella.

Tabla II.- Principales especies producidas en acuicultura en 2008 (APROMAR, 2011)

ESPECIE	NOMBRE CIENTÍFICO	VALOR*	% CRECIMIENTO ANUAL
Langostino blanco	<i>Litopenaeus vannamei</i>	7.374	1,6
Salmón del Atlántico	<i>Salmo salar</i>	5.140	-8,8
Carpa herbívora	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	4.233	10,3
Carpa plateada	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	4.177	9,4
Carpa común	<i>Cyprinus carpio</i>	3.349	11,4
Cangrejo de canal chino	<i>Eriocheir sinensis</i>	3.198	10,4
Langostino tigre	<i>Penaeus monodon</i>	2.918	9,0
Tilapia del Nilo	<i>Oreochromis niloticus</i>	3.027	16,4
Carpa catla	<i>Gibelion catla</i>	2.916	-1,7
Trucha arcoíris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	2.721	25,4
Total de las 10 especies principales		39.055	6,0
Total resto de especies		49.064	4,7
Total acuicultura mundial		88.119	5,3
Dorada (<i>Sparus aurata</i>) (Ranking 38º especie)		582	5,1
Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>) (Ranking 39º especie)		539	-13,6
Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>) (Ranking 47º especie)		425	6,8

* Valor Comercial en millones de euros

II.1.2.- La acuicultura en la Unión Europea

La producción de pescado mediante procedimientos modernos ha sido desde sus inicios en Europa un ejemplo satisfactorio de esta nueva actividad económica. En 2009 la Unión Europea llegó a producir 1.276.170 toneladas de productos de la acuicultura, representando el 19,6% del volumen de la producción acuática total (acuicultura y pesca extractiva), lo que supone un ligero aumento en lo que respecta al año anterior que fue del 19,2%.

Entre los principales productos producidos en la Unión Europea se encuentran pescados de alto valor comercial y los moluscos, con unos volúmenes de producción del 49,4 % para peces y del 50,6 % para moluscos, mientras que económicamente representa el 69,6% y 30,4%, respectivamente.

La producción total de productos acuáticos (acuicultura y pesca) en la Unión Europea alcanzó un máximo de 10,6 millones de toneladas en 1988. Desde entonces no ha cesado de decrecer a un ritmo anual del -2,2%. En 2009 esa cifra global se situó en 6,5 millones de toneladas. La producción de la acuicultura, aunque ligeramente creciente, ha sido insuficiente para compensar la caída de la pesca extractiva.

En 2009 en la Unión Europea se produjeron 629.401 toneladas de pescado procedentes de la acuicultura, representado un 0,9 % más que en el año 2008. La principal especie cultivada en la Unión Europea es la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), de la que en 2009 se produjeron 195.544 toneladas, lo que representa un 32,1% del total de la producción europea de la acuicultura. La segunda especie es el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con 146.424 toneladas (23,3% del total). La tercera especie es la dorada (*Sparus aurata*) con 96.419 toneladas (15,3%). El Reino Unido es el Estado Miembro de la Unión Europea con una mayor producción de pescado de acuicultura en 2009, tanto en toneladas (147.035 toneladas, es decir, el 23,4%) como en valor (474 millones de euros, el 19,8%). Grecia es el segundo productor con 99.581 toneladas (15,8%) y 431 millones de euros (18,0%), mientras que España es el tercer país productor, con 64.200 toneladas (10,2%) y 286 millones de euros (15,5%).

A pesar de todas estas cifras, puede concluirse que la piscicultura en la Unión Europea lleva estancada desde el año 2000 y no está desarrollando su potencial creador de riqueza y de empleo, todo ello a pesar de contar con condiciones físicas y ambientales adecuadas, tecnología puntera y empresas dispuestas a invertir. Por otra parte, este sector ha demostrado disponer de los conocimientos y medios para ser una actividad sostenible desde el punto de vista medioambiental, a la vez de ofrecer productos sanos, seguros y de calidad (APROMAR, 2011).

II.1.3.- La acuicultura en España

En España la mayor producción acuícola corresponde a moluscos, especialmente mejillones (*Mytilus mytilus*) con un 74% de la producción total, seguida por la producción de peces marinos que supone un 16% y un 10% para peces de acuicultura continental. Pero en 2010, la producción de peces marinos de cultivo tuvo una reducción del 9,4% respecto del año anterior, produciendo solo 43.888 toneladas anuales. Esta caída de las producciones ha ocurrido en todas las especies relevantes (dorada (*Sparus aurata*), lubina

(*Dicentrarchus labrax*) y rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y supone la primera reducción en los últimos 25 años de esta actividad. Es necesario recordar que en los primeros años de la presente década se habían registrado crecimientos medios del 20%, pero en los actuales momentos estos porcentajes han ido decreciendo, siendo necesario mantener un mínimo entre el 15 y 20% anual, para poder ser competitivos a nivel global.

Actualmente, la Comunidad Autónoma de Valencia es la mayor productora de dorada (*Sparus aurata*) con el 37% de la producción total de esta especie a nivel nacional. En otras Comunidades Autónomas destaca Canarias con la lubina (*Dicentrarchus labrax*) ocupando el 30% de la producción total, Galicia en la que la producción de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) alcanza el 97% y de lenguado el 83% de la producción total en España, y Murcia donde la corvina (*Argyrosomus regius*) representa el 56%.

II.1.4.- La acuicultura en las Islas Canarias

La Acuicultura en el Archipiélago Canario comienza a desarrollarse en la década de los 80 en Gran Canaria y Tenerife. La temperatura de las aguas que bañan el archipiélago, así como la calidad de la misma, constituyen el principal atractivo para las empresas que deciden instalar su actividad acuícola en las islas.

Las especies más importantes cultivadas en Canarias son la dorada (*Sparus aurata*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*) aunque también hay que tener en cuenta el cultivo de otras especies como el lenguado común (*Solea solea*), la corvina (*Argyrosomus regius*) o el bocinegro (*Pagrus pagrus*). Las Islas Canarias son la primera Comunidad Autónoma productora de lubina (*Dicentrarchus labrax*), con el 30% del total nacional. El resto de la producción de lubina (*Dicentrarchus labrax*) se distribuye entre Andalucía (29%), Murcia (19%), Valencia (19%) y Cataluña (2%). Asimismo, Canarias es la tercera Comunidad Autónoma productora de dorada (*Sparus aurata*) con un 15% de la producción total, y segundo en lenguado con el 15% (APROMAR, 2011).

Según los datos proporcionados por la Viceconsejería de Pesca del Gobierno de Canarias, en Canarias se cultivaron unas 6.810 toneladas de dorada (*Sparus aurata*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*) en 2010, lo que representa un ligero descenso respecto al año 2009. El sector acuícola canario, pese a que también sufre las consecuencias de la crisis, es optimista y considera que tiene futuro, por ello se sigue trabajando para conseguir

abrir nuevos mercados que den salida a dicha producción. Además, en los próximos años se prevé que el desarrollo de esta actividad sea exponencial, una vez aprobado el Plan Regional de Ordenación de la Acuicultura en Canarias, pero para que esto suceda, se deben mejorar algunos aspectos, como la no dependencia de la importación de alevines desde la península, ya que al día de hoy canarias no cuenta con instalaciones que se dediquen a la reproducción de peces para la venta (APROMAR, 2011).

II.2.- LAS ENFERMEDADES EN PISCICULTURA MARINA

En los últimos años, el aumento global de la producción de las especies acuáticas cultivadas se ha asociado con un aumento en el número y propagación de enfermedades infecciosas y parasitarias. Dichas enfermedades se presentan en los colectivos de peces, moluscos y crustáceos y pueden ser causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos (Sindermann, 1990) y se pueden presentar en diferentes ambientes, como el marino, salobre o dulceacuícola. Pero para que se manifieste la enfermedad debe haber una interacción entre el patógeno, el hospedador y el medio ambiente (Toranzo y col., 2005), por lo que la aparición de las enfermedades infecciosas se encuentra normalmente asociada al deterioro de la calidad del medio acuático, a situaciones de estrés o factores nutricionales.

En términos de producción, las enfermedades infecciosas son la causa mayoritaria de las pérdidas económicas en granjas acuícolas debido a la alta mortalidad de los animales, los costes de los tratamientos y el descenso de la producción.

II.2.1.- Enfermedades parasitarias

Los peces marinos pueden ser parasitados por diferentes especies, desde ectoparásitos de piel y branquias, hasta endoparásitos que parasitan órganos internos. Su presencia en peces cultivados depende en gran parte de las condiciones de cultivo, del origen de los peces y del ciclo de vida de los parásitos (Pellitero y col., 1988). La gravedad de las lesiones provocadas por los parásitos depende de diversos factores relacionados con el género del agente causal, su localización y el modo particular de actuación sobre el hospedador (Pavanelli y col., 1998). En España, entre las enfermedades parasitarias más importantes en piscicultura marina podemos encontrar las causadas por:

II.2.1.1.- *Cryptocaryon irritans*

Este protozoo ciliado es uno de los patógenos más comunes del medio marino. Se considera patógeno oportunista, y la enfermedad se manifiesta bajo malas condiciones de cultivo, como puede ser cambios de temperatura y la presencia de un elevado contenido de materia orgánica. Los peces presentan problemas respiratorios, exceso de mucus en branquias y piel, natación errática, aleta caudal deshilachada, y en algunos casos se aprecia una nube en los ojos, llegándose a producir elevada mortalidad. Esta parasitosis se presenta habitualmente más en tanques de tierra que en jaulas flotantes, debido a la peculiaridad del ciclo de vida de este parásito. Existen varios tratamientos muy efectivos que pueden ser utilizados, como baños con formol, sulfato de cobre, disminución de la salinidad, pero el mejor tratamiento es la prevención mediante el tratamiento del agua de entrada a la explotación con radiación ultravioleta u ozono, así como el aumento en el caudal del agua de entrada de la explotación (Colorni, 1987).

II.2.1.2.- *Amyloodinium ocellatum*

Es un ectoparásito dinoflagelado, más conocido como velvet marino (enfermedad de terciopelo marino). Es uno de los patógenos más frecuentes en las infestaciones de los peces marinos (Michael, 2002; Joshi, 2003). La dificultad respiratoria de los peces parasitados es el signo clínico más común debido a que las branquias son su primer sitio de fijación. Otros síntomas son la anorexia y el comportamiento natatorio errático, cubriéndose finalmente de un manto aterciopelado, de donde la enfermedad obtiene su nombre. Frecuentemente las infestaciones masivas producen alta mortalidad y está asociada a altas temperaturas y baja concentración de oxígeno. *Amyloodinium ocellatum* ha mostrado su preferencia por infestar primero el tejido de las branquias de los peces, y una vez que se difunde por el resto del cuerpo, se considera que éste queda muy afectado y que tal vez no pueda recuperarse. Como medida preventiva se recomienda la limpieza profunda de los tanques, la realización de baños con agua dulce durante 2-4 minutos, o sulfato de cobre 0,75 mg/l durante 12-14 días (Eiras, 1994).

II.2.1.3.- *Furnestinia echeueis* y *Sparycotyle chrysophrii*

Son los ectoparásitos más abundantes en peces, perteneciendo a las Familias *Diplectanidae* y *Microcotylidae*, respetivamente. Generalmente viven sobre la superficie externa, aletas, branquias, ojos y cavidad oral y branquial. Son bastante específicos de su hospedador, y las infestaciones son graves en primavera y verano, provocando mortalidad

crónica significativa. La infestación se favorece por malas condiciones en el cultivo, como pueden ser la elevada densidad de animales, temperaturas elevadas y escasa renovación de agua. Los peces infestados se muestran letárgicos, con pérdida de apetito, dificultad respiratoria, pudiendo observarse branquias pálidas con zonas inflamadas. Para su tratamiento son muy utilizados los baños con formol, pero la mejor opción son las medidas profilácticas y un manejo adecuado.

II.2.1.4.- *Enteromyxum leei*

Este parásito, de la Familia *Myxozoa*, afecta al tracto digestivo de los peces produciendo una enteritis severa. Los peces mueren emaciados y con distensión abdominal. Las medidas de control se basan en un buen manejo y evitar el estrés.

II.2.2.- Enfermedades víricas

Las enfermedades infectocontagiosas de origen vírico son uno de los problemas con mayor impacto en el desarrollo de la acuicultura, ya que generalmente provocan grandes mortalidades y frente a ellas no existen tratamientos efectivos. En España, en las enfermedades víricas descritas hasta la fecha en piscicultura marina debemos considerar:

II.2.2.1.- Encefalopatía y retinopatía viral

La infección causada por un betanodavirus se caracteriza por la vacuolización y necrosis del sistema nervioso central y la retina. La enfermedad se produce principalmente durante el estado larvario y juvenil, pero los reproductores y peces adultos también se pueden ver afectados, siendo la lubina (*Dicentrarchus labrax*) una de las especies más sensibles a la infección. En general, esta enfermedad se caracteriza por la presentación de una clínica con alteraciones neurológicas con incoordinación locomotriz y fuerte distensión abdominal debido a una hiperinsuflación de la vejiga natatoria. La transmisión de la enfermedad es tanto horizontal como vertical, y la presentación de la clínica se ve favorecida por el estrés asociado a temperaturas del agua de mar cercanas a los 25°C.

II.2.2.2.- Linfocistis

El virus de linfocistis pertenece al Género *Lymphocystivirus*, incluido dentro de la Familia *Iridoviridae*. La enfermedad se caracteriza por hipertrofia de células fibroblásticas del tejido conectivo intersticial que origina la formación de nódulos tumorales de color

blanco grisáceo. Los síntomas aparecen cuando los peces sufren algún proceso de estrés, apareciendo numerosas tumoraciones que cubren gran parte de la superficie corporal y que, aunque frecuentemente no provocan la muerte del animal, pueden llegar a ocasionar serios problemas económicos, ya que impide su comercialización hasta la resolución y cicatrización de las lesiones, siendo la dorada (*Sparus aurata*) la especie más afectada en el sur de España (Cano y col., 2006).

II.2.3.- Enfermedades bacterianas

Las infecciones bacterianas son un problema muy común en la acuicultura marina española. La mayoría de estas infecciones son causadas por microorganismos Gram negativos, entre los que destacan las producidas por los Géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Tenacibaculum*, y *Photobacterium*. Dentro de los Gram positivos, las causadas por diferentes especies del Género *Streptococcus* son las de mayor interés. La mayoría de estos agentes patógenos se encuentran en el medio marino y únicamente ocasionan daño, cuando por ciertas circunstancias, éstos sobrepasan las barreras defensivas de los peces (Gatesoupe y col., 1999). A continuación, detallamos brevemente las enfermedades bacterianas más importantes en la acuicultura marina española.

II.2.3.1.- Pasteurelisis

Esta enfermedad está causada por la bacteria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, antes denominada *Pasteurella piscicida*, también se conoce como pseudotuberculosis debido a la formación de nódulos blancos en órganos internos, principalmente en bazo y riñón. En los animales enfermos se aprecia externamente hemorragias en la base de las aletas y distensión abdominal por la acumulación de líquido ascítico.

Esta enfermedad produce elevada mortalidad con temperaturas superiores a los 20°C. Por debajo de esta temperatura, los peces pueden albergar al patógeno sin presentar signos evidentes de la enfermedad durante largos periodos de tiempo (Magariños y col., 2001). La mayoría de los brotes se presentan en larvas y alevines hasta los 30 gramos, y puede afectar a varias especies de peces, entre las que encontramos a la dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), y, últimamente el lenguado (*Solea* sp.). Para su control se usan antibióticos de amplio espectro como la oxitetraciclina. Además, existen en

el mercado varias vacunas comerciales, con una eficacia que depende en gran medida de la especie y talla del pez (Toranzo y col., 2005).

II.2.3.2.- Vibriosis

Las vibriosis son infecciones que están producidas por diferentes especies del Género *Vibrio*, viéndose afectados tanto peces como moluscos y crustáceos de diferentes medios (marino, dulce o salobre). La vibriosis se caracteriza por un cuadro de curso agudo, con una sintomatología típica de septicemia hemorrágica. La enfermedad aparece ligada a una situación de estrés y/o grave deterioro del medio en que viven los peces.

Existen más de 40 especies de vibrios reconocidos que causan infecciones en el medio marino, entre los que destacan *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. ordalii*, *V. salmonicida* y *V. vulnificus*, siendo *V. anguillarum* el patógeno de referencia de este grupo. Los peces afectados presentan signos típicos de una septicemia generalizada con hemorragias en la base de las aletas, exoftalmia y opacidad corneal. Los animales moribundos se muestran frecuentemente anoréxicos y presentan branquias pálidas como reflejo de una severa anemia. Para su control se usan antibióticos de amplio espectro y vacunas comerciales (Toranzo y col., 2005).

II.2.3.3.- Flexibacteriosis

El principal agente causal de esta enfermedad en peces marinos es *Tenacibaculum maritimum* (antes denominado *Flexibacter maritimus* o *Cytofaga marina*). Peces adultos y juveniles pueden ser infectados por esta bacteria, que se comporta como un patógeno oportunista, pero son los peces jóvenes los más susceptibles a la enfermedad. La prevalencia y gravedad del brote se produce con temperaturas por encima de los 15°C. Además de la temperatura del agua, la flexibacteriosis marina está influenciada por una serie de factores medioambientales como una escasa renovación de agua y disminución en el aporte de oxígeno, y factores relacionados con el hospedador (Pazos y col., 1993).

En general, los peces afectados presentan úlceras profundas en piel, boca erosionada, aletas deshilachadas y podredumbre en la cola. La pérdida de la superficie epitelial de la piel, típico de esta enfermedad, permite también una puerta de entrada de otras bacterias y parásitos. Para su control usualmente se utiliza baños con formol, antibióticos o vacunas (Romalde y col., 2005).

II.2.3.4.- Estreptococosis

La taxonomía modificada desveló que al menos cuatro géneros bacterianos: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* y *Enterococcus*, eran los responsables de la estreptococosis de los peces (Doménech y col., 1996), siendo todos ellos cocos Gram positivos, oxidasa y catalasa negativos. A pesar del progreso en la taxonomía y el diagnóstico, la base patológica de este grupo de enfermedades no se ha abordado en profundidad, y es difícil diferenciar entre estos cuatro géneros bacterianos mediante pruebas convencionales clásicas, debido a que las infecciones causadas por cocos Gram positivos producen lesiones no específicas para cada género, pudiendo observar en los peces infectados hemorragias, congestión y oftalmítis (Doménech y col., 1996; Zlotkin y col., 1998).

La estreptococosis se trata de una enfermedad reemergente que afecta a una gran variedad de especies silvestres y de cultivo, tanto marina como continental. El sector de la acuicultura ha sufrido enormes pérdidas económicas por la enfermedad causadas por diversas especies del Género *Streptococcus*, como *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis*, *S. phocae* y *S. iniae*, *Lactococcus garvieae*, *Vagococcus salmoninarum* y *Lactococcus piscium* (Toranzo y col., 2005). Recientemente se ha descrito el interés de *S. iniae* para especies piscícolas en Canarias (ElAamri y col., 2010). Actualmente, el término estreptococia se considera como un complejo de enfermedades similares causadas por diferentes géneros y especies antes mencionados, capaces de inducir daño al sistema nervioso central, con exoftalmia supurativa y meningoencefalitis (Toranzo y col., 2005). La enfermedad se controla con antibióticos de amplio espectro, vacunas comerciales, o a nivel experimental, mediante la administración de microorganismos probióticos (Sako, 1993; Sakai, 1999).

II.3.- VIBRIOSIS EN ACUICULTURA

II.3.1.- Etiología

Los vibrios fueron uno de los primeros grupos bacterianos en ser reconocidos y descritos taxonómicamente en la naturaleza (Pacini, 1854). Se clasifican dentro de la Familia *Vibrionaceae*, y abarca diversos grupos de bacterias marinas heterótrofas. Morfológicamente son bacilos curvados Gram negativos, oxidasa positivo, mesófilos, y

generalmente móviles por medio de un flagelo polar (Thompson y col., 2004). Toleran un amplio rango de salinidades, y la mayoría de las especies requieren al menos una concentración mínima de 0,5% NaCl en el medio para su crecimiento, pero existen especies que pueden crecer en ausencia de cloruro de sodio (Gómez-Gil y col., 2004). Crecen rápidamente a 25-30°C en medio selectivo y diferencial para vibrios como el Agar Tiosulfato Citrato sales Biliares Sacarosa (TCBS) formando colonias amarillas por la utilización de la sacarosa, aunque también pueden crecer en otros medios enriquecidos como el medio Agar Infusión Cerebro Corazón (BHIA) o el Agar Trypticase Soja (TSA), donde forman colonias circulares de color crema. Bioquímicamente se caracterizan por ser anaerobios facultativos, con capacidad de fermentar la D-glucosa sin producción de gas, sensibles al agente vibriostático O129 y al antibiótico noboviocina. Además son positivos para las pruebas del Indol, Voges Proskauer, Gelatinasa, y negativos para la descarboxilación de los aminoácidos Lisina y Ornitina, aunque hay una reacción positiva en la descarboxilación de la Arginina. En la Tabla III detallamos algunas de las características bioquímicas para la identificación de este patógeno mediante el sistema miniaturizado de identificación API 20E de BioMérieux (Buller, 2004).

Tabla III.- Características bioquímicas para la identificación de *Vibrio anguillarum*, según la galería API 20E (BioMérieux)

PRUEBA	RESULTADO	PRUEBA	RESULTADO
GRAM	-	IND	+
OXIDASA	+	VP	+
MOVILIDAD	+	GEL	+
O/F	+	GLU	+
ONPG	-	MAN	+
ADH	+	INO	-
LDH	-	SOR	+
ODC	-	RHA	-
CIT	+	SAC	+
H ₂ S	-	MEL	-
URE	-	AMY	+
TDA	-	ARA	+

II.3.2.- Epidemiología y Patogenia

El término vibriosis define una infección sistémica primaria, causada por varias especies de vibrios patógenos, donde *Vibrio anguillarum*, es el principal agente causante de epizootias. Este patógeno es importante en acuicultura por causar enormes pérdidas económicas a este sector, afectando especialmente a peces de ambientes marinos y salobres (Salmónidos y Perciformes), aunque también lo podemos encontrar en una gran variedad de moluscos y crustáceos (Korun y Timur, 2008).

Presenta una amplia distribución geográfica, causando septicemia hemorrágica típica en más de 50 especies de peces, tanto de aguas cálidas como frías, donde podemos encontrar algunas especies como la anguila europea (*Anguilla anguilla*), anguila japonesa (*Anguilla japonica*), ayu (*Plecoglossus altivelis*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Sparus aurata*), bacalao (*Gadus morhua*), fletán (*Hippoglossus hippoglossus*), salmón plateado (*Oncorhynchus* spp.), salmón del Atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*), sargo (*Acanthopagrus cuvieri*), perca gigante (*Lateolabrax japonicus*) y medregal (*Seriola quinqueradiata*) (Anderson y Conroy, 1970; Strout y col., 1978; Tolmasky y col., 1985; Actis y col., 1999; Austin y Austin, 1999; Toranzo y col., 2005; Planas y col., 2006), pero los brotes generalmente se presentan entre primavera y otoño cuando existen cambios bruscos en la temperatura del agua. Como hemos visto, esta enfermedad es un proceso que está relacionado con la calidad y temperatura del agua, pero también se puede presentar como consecuencia de la contaminación producida por las heces de animales portadores (Sinderman, 1990).

De forma natural, las diferentes especies del Género *Vibrio* que habitan en ambientes marinos y salobres son parte del tracto gastrointestinal de los organismos y se encuentran en dos formas, planctónicas en la columna de agua, y bentónica desarrollando biopelículas en el sedimento. Los vibrios juegan un papel importante en el ecosistema marino biodegradando la materia orgánica, pero también pueden actuar como patógenos de organismos acuáticos de importancia comercial (Leyton y Riquelme, 2008).

Si bien para *V. anguillarum* se han descrito 23 serotipos (serotipo O1 al O23), según la nomenclatura europea (Pedersen y col., 1999), solo los serotipos O1 y O2, y en menor grado, el serotipo O3, son los responsables de la mayor parte de los brotes ocurridos

en la industria acuícola, mientras que los aislados pertenecientes a los restantes serotipos son considerados ambientales y no patogénicos (Toranzo y Barja, 1990). La vía de entrada no está bien definida aunque se sabe que las mucosas juegan un papel muy importante en este proceso (O'Toole y col., 2004).

La habilidad de la bacteria para causar daño depende de muchos parámetros que permiten establecer al patógeno dentro del hospedador (Horne y Baxendale, 1983). Diferentes factores de virulencia están implicados en la patogenia de *V. anguillarum*, como son los sistemas de captación del hierro por la presencia de plásmidos (Crosa, 1980), presencia de más de un flagelo (Norqvist y Wolf-Watz, 1993), adhesinas y factores de adherencia (García y col., 1997; Rodkhun y col., 2006), lipopolisacáridos (O'Toole y col., 1997) o productos extracelulares que incluyen enzimas extracelulares (gelatinasa, elastasa, lecitinasa, lipasa), las citolisinas, citotoxinas, hemolisinas, enzimas proteolíticas y toxinas termoestables (Vázquez y col., 2005b). El factor de virulencia más estudiado es el sistema de captación de hierro codificado por el plásmido pJM1 de 65 Kpb. Los componentes de este sistema son un sideróforo llamado anguibactina y una compleja membrana receptora. Estos dos componentes son promovidos cuando la bacteria crece bajo condiciones limitantes de hierro. En la actualidad, gracias al estudio del genoma se han podido determinar varios genes relacionados con la virulencia de este patógeno (Rodkhun y col., 2005).

II.3.3.- Clínica y Lesiones

La vibriosis engloba un conjunto de síntomas característicos. Generalmente los peces presentan externamente las típicas lesiones de una septicemia hemorrágica, que se extiende en la piel principalmente alrededor de la cabeza, vientre y ano, así como en la base de las aletas. Asociado a este cuadro de septicemia hemorrágica, también es común observar exoftalmia bilateral y distensión abdominal. Con frecuencia los peces infectados presentan anorexia y anemia. Las branquias son pálidas con un exceso de secreciones mucosas pero, por lo general, no presentan necrosis. A nivel interno se puede observar un aumento del tamaño del bazo, petequias en hígado, y el intestino lleno de líquido transparente, acentuándose estos síntomas en intestino posterior y recto debido al gradiente de pH existente que limita el crecimiento de *V. anguillarum* en medio ácido (Noga y col., 2000). La vejiga natatoria se encuentra distendida en los peces moribundos lo que hace que estos animales naden muy cerca de la superficie. En casos agudos, el curso de la infección

es rápido, y la mayoría de los peces infectados mueren sin presentar síntomas clínicos (Actis y col., 1999).

En cuanto a los alevines, éstos no presentan la típica forma hemorrágica aguda, y simplemente se observa degeneración del tejido cartilaginoso de los labios con un leve enrojecimiento de la piel alrededor de la mandíbula inferior y del opérculo. Asimismo, se ven a los alevines nadando lentamente muy cerca de la superficie, pero en algunas ocasiones pueden presentar una necrosis profunda en la cola y aleta caudal (Hjeltnes y Roberts, 1993).

II.3.4.- Diagnóstico

El diagnóstico se realiza con la observación de los signos clínicos, y su confirmación se realiza mediante el aislamiento e identificación del patógeno *V. anguillarum*, aunque también existen en el mercado kits rápidos de identificación. El cultivo se realiza a partir de órganos internos en diferentes medios de cultivo como el Agar sangre, TSA o el medio TCBS, para posteriormente identificar el patógeno por pruebas bioquímicas convencionales, sistema API (BioMérieux), pruebas inmunológicas como ELISA o serológicas para la confirmación del serotipo, así como también mediante métodos moleculares (PCR) (González y col., 2003).

II.3.5.- Métodos de prevención

La prevención frente a esta enfermedad se realiza mediante la vacunación y unas buenas normas de manejo que eviten el estrés, unidas a unas buenas medidas higiénicas. Para ello es necesario disminuir al máximo la contaminación orgánica, controlar los factores ambientales como oxígeno y temperatura, y evitar la manipulación excesiva de los peces (Sommerset y col., 2005).

Existen en el mercado vacunas comerciales monovalentes y polivalentes contra la vibriosis. Este tipo de vacunas tradicionales denominadas bacterinas, consisten en utilizar la misma cepa bacteriana inactivada mediante tratamientos físicos, químicos, biológicos o una combinación de varios de estos métodos. También se han propuesto vacunas en las que se incluyen componentes de su propia membrana celular. En general, las vacunas dan una mejor protección del pez cuando son administradas por vía intraperitoneal, pero el método

mayoritariamente utilizado es mediante baño. Por otra parte, además de vacunas inactivadas, también se han utilizado vacunas hechas con la bacteria viva, pero modificada genéticamente (Ward y col., 1986; Norqvist y col., 1989).

En especies marinas como la lubina (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Sparus aurata*) y rodaballo (*Scophthalmus maximus*), para controlar la vibriosis se vacuna por baño con una mezcla de bacterinas (serotipos O1 y O2) con peces de un tamaño entre 1 y 2 gramos, siendo necesario repetir la vacunación en espacios cortos de tiempo (3 veces en un mes) para obtener una mejor inmunización (Esteve-Gassent y col., 2004; Toranzo y col., 2005).

II.3.6.- Tratamiento

El tratamiento frente a la vibriosis se realiza mediante el uso de antibióticos de amplio espectro como la oxitetraciclina, nitrofurantoina, trimetoprim, florfenicol y ácido oxolínico (Aoki y col., 1984; Seljestokken y col., 2006). Estos medicamentos normalmente son administrados como aditivo en el alimento, pero los peces enfermos al presentar anorexia, no ingieren el pienso medicado adecuadamente, por lo que se dificulta su tratamiento por vía oral. No obstante, el uso excesivo de antibióticos y otros agentes quimioterapéuticos ha derivado en la aparición de cepas bacterianas resistentes, por lo que hoy en día alguno de estos han perdido su efectividad frente al control de la vibriosis (Jun y Woo, 2003; Li y col., 2006; Leyton y Riquelme, 2008). Por esta razón, es aconsejable el uso de inmunoestimulantes o de otras bacterias que inhiban el crecimiento de este patógeno, como el empleo de probióticos (Agius y col., 1983; Westerdahl y col., 1991; Sharifuzzaman y Austin, 2009; Chistiakov y col., 2010).

II.4.- ANTIBIÓTICOS EN ACUICULTURA

La práctica de la acuicultura, particularmente la forma intensiva, requiere a menudo el uso de agentes terapéuticos como métodos curativos y/o profilácticos. Estos agentes terapéuticos incluyen a los antibacterianos, antiparasitarios, antifúngicos, hormonas, etc. El número de sustancias químicas usadas en acuicultura es amplia, ya que son muchas las razones por las que pueden ser usadas, al requerirse en actividades básicas que van desde el mantenimiento de las instalaciones acuícolas y la desinfección de agua, hasta la obtención de color o la determinación del sexo en los peces (Alderman, 1998).

Los antibióticos no se han utilizado siempre de forma responsable en la acuicultura, lo que ha llevado al desarrollo de bacterias resistentes (Kesarodi-Watson y col., 2008), además de ocasionar posibles riesgos para la salud pública. Los riesgos medio-ambientales originados por su uso continuado están relacionados con su presencia en el medio acuático. Se tiene constancia de que la vida media de algunos antibióticos como la oxitetraciclina en sedimentos puede variar de 9 a 14 días, dependiendo de las corrientes de agua y de factores ambientales, provocando la destrucción de determinadas comunidades microbianas, y por ello el deterioro del medio ambiente.

El reconocimiento de los riesgos asociados al uso de antibióticos ha llevado a muchos países de todo el mundo a modificar la legislación vigente sobre el empleo de antibióticos en general. Por tal razón, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) junto a varios gobiernos nacionales han planteado la limitación del uso de antibióticos en todos los sectores de la producción, y con especial énfasis en la acuicultura (Avella y col., 2010).

Dentro del sector acuícola, se han establecido los límites máximos de residuos (LMR) de aquellas sustancias que supongan daños conocidos, y en algunos casos su total prohibición. Estados Unidos, Canadá y la Unión Europea han aprobado un limitado grupo de antibióticos para su uso en acuicultura debido a que en la industria del salmón, carpa y langostinos se llegaron a utilizar enormes cantidades de estas sustancias provocando la aparición de bacterias resistentes a los mismos (FAO, 2002).

Existen varias estrategias para enfrentar el problema de los antibióticos en acuicultura. La primera consiste en limitar su uso en las empresas acuícolas o en su defecto establecer o aplicar obligatoriamente los límites máximos de residuos establecido en el *Codex Alimentarius* (Tabla IV). Una segunda opción consiste en evitar que los animales enfermen utilizando vacunas específicas e inmunoestimulantes, o bien a través del uso de microorganismos que actúen como probióticos.

Tabla IV.- Límites máximos de residuos (LMR) de antibióticos y quimioterapéuticos para la acuicultura en la Unión Europea (FAO, 2002)

PRODUCTO	LMR (µg/Kg)	ESPECIE	REGLAMENTO DEL CONSEJO
Sulfonamidas	100	Productoras de alimento	508/1999/CE
Trimetoprim	50	Peces	508/1999/CE
Amoxicilina	50	Productoras de alimento	508/1999/CE
Ampicilina	50	Productoras de alimento	508/1999/CE
Benzilpenicilina	50	Productoras de alimento	508/1999/CE
Cloxacilina	300	Productoras de alimento	508/1999/CE
Dicloxacilina	300	Productoras de alimento	508/1999/CE
Oxacilina	300	Productoras de alimento	508/1999/CE
Penetamato	50	Productoras de alimento	508/1999/CE
Sarafloxacina	30	Salmónidos	508/1999/CE
Clortetraciclina	100	Productoras de alimento	508/1999/CE
Oxitetraciclina	100	Productoras de alimento	508/1999/CE
Tetraciclina	100	Productoras de alimento	508/1999/CE
Flumequine	600	Salmónidos	2728/1999/CE
Ácido oxolínico	300	Peces	807/2001/CE
Florfenicol	1000	Peces	1322/2001/CE

II.5.- VACUNAS EN ACUICULTURA

La vacunación es una herramienta tradicionalmente utilizada en acuicultura como método preventivo para el control de enfermedades infecciosas. El primer ensayo en peces fue descrito por Duff en 1942, quien vacunó oralmente truchas contra la forunculosis con una cepa de *Aeromonas salmonicida* inactivada con cloroformo. Estos peces fueron posteriormente enfrentados al patógeno y se obtuvo un buen nivel de protección, comparado con las mortalidades de los peces no protegidos por la vacuna. Sin embargo, numerosos ensayos posteriores no pudieron reproducir el éxito original de este primer estudio.

La primera vacuna comercial se registró en Estados Unidos y fue contra la enfermedad de la boca roja en 1976. Simultáneamente, algunos investigadores de la Universidad Estatal de Oregón desarrollaron vacunas efectivas contra la vibriosis, dando

origen al nacimiento de la producción industrial de vacunas en acuicultura (Sommerset y col., 2005).

Hoy en día, laboratorios como Hypra, Europharma y Schering-Plough tienen en el mercado vacunas comerciales como Icthiovac-TM, Icthiovac-VR, Icthiovac-PD, Alpha Marine, Aquavac, Garvetil, Furovac y Vibrogen 2, que actúan frente a la mayoría de las enfermedades infecciosas que afectan a la acuicultura como la vibriosis, forunculosis, pasteurelisis, enfermedad entérica de la boca roja, flavobacteriosis, septicemia entérica causada por *Edwardsiella*, lactococosis, estreptococosis y piscirickettsiosis, entre otras (Sommerset y col., 2005). Los principales métodos de vacunación en los peces utilizan la inmersión en la solución vacunal, la inyección intraperitoneal, inyección intramuscular (para vacunas ADN), administración oral, infiltración anal y el método de spray (Penagos y col., 2009). Los tipos de vacunas existentes, basadas en su contenido son:

- **Vacunas muertas o inactivadas.**- También conocidas como bacterinas, son producidas a partir de un cultivo inactivado de la bacteria causante de la enfermedad. El tratamiento suele ser con formaldehído, fenol, cloroformo, etanol, etc o bien por calentamiento, congelación sonicación o luz UV.
- **Vacunas subcelulares.**- Este tipo de vacunas están compuestas por toxinas inactivadas producidas por el patógeno, como pueden ser los productos extracelulares, fimbrias, material capsular aislados del propio microorganismo o purificados en laboratorio (Rappuoli y Del Giudice, 1999), inactivados, en su caso.
- **Vacunas vivas.**- Por los estudios realizados, este tipo de vacuna presenta grandes ventajas ya que simula las condiciones reales de la enfermedad. En acuicultura este tipo de vacunas ha tenido especial interés en enfermedades víricas, donde los cultivos vivos utilizados son cepas avirulentas naturales, mutantes producidos espontáneamente o cepas derivadas empíricamente de mutagénesis química o pases *in vitro* (Norqvist y col., 1994).
- **Vacunas recombinantes.**- También llamadas vacunas ADN, en ellas se clona el o los antígenos del patógeno capaz de despertar una respuesta inmune en el pez tras su administración. Recientemente, este tipo de vacunas ha demostrado resultados prometedores en diferentes ensayos experimentales contra enfermedades víricas, ya que induce potentes respuestas inmunitarias (Rocha y col., 2002).

II.6.- INMUNOESTIMULANTES EN ACUICULTURA

Los inmunoestimulantes son sustancias biológicas o productos químicos sintéticos que actúan sobre el sistema inmune, potenciando la función de los fagocitos y otros componentes del sistema inmune aumentando su actividad bactericida (Sakai, 1999). En la práctica todos los inmunoestimulantes son suplementos dietéticos y su uso está bastante extendido ya que permite a los animales poseer mayor resistencia frente a infecciones virales, bacterianas, hongos y parásitos, pero algunas de estas sustancias utilizadas no siempre son adecuadas en la acuicultura (Robertsen y col., 1990). A pesar de ello, su uso es bastante habitual en el sector acuícola, con el objetivo de incrementar la supervivencia ante cualquier situación estresante, como puede ser transporte, cambios de temperatura, manipulación periódica, o problemas patológicos.

Los inmunoestimulantes que están actualmente disponibles en el mercado se han utilizado en diversas especies de peces, tanto marinos como de agua dulce así como también en crustáceos. Estas sustancias son derivados de extractos celulares de microorganismos como de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), levaduras modificadas, o hidrolizadas con altos contenidos en oligosacáridos y nucleótidos (Kogan y Kocher, 2007).

El inmunoestimulador más conocido y estudiado en peces es el 1,3- β glucano ya que mejora la respuesta inmune no-específica, estimulando la actividad de la lisozima, del complemento, la acción fagocítica de los macrófagos, y la resistencia contra las infecciones bacterianas y virales, siendo utilizado para prevenir y reducir la mortalidad de los animales (Kumari y Shaoo, 2006; Sealey y col., 2008).

El método más eficaz de administración de estas sustancias en los peces es por inyección, pero el más utilizado es la vía oral ya que minimiza la manipulación y puede ser usado en todos los tamaños de peces (Sakai, 1999), aunque la respuesta en los animales dependerá del tipo de producto utilizado, de la dosis suministrada, del régimen y vía de administración, o de la asociación con otros inmunoestimulantes (Bagni y col., 2005; Ai y col., 2007).

En otras investigaciones se ha visto que la administración en la dieta de quitina, lactoferrina, 1-3 β glucano, levamisol y vitamina C aumentan la resistencia a enfermedades

bacterianas en especies de peces de agua dulce y marina producidas por *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Edwardsiella*, *Yersinia ruckeri*, *Streptococcus* sp. (Anderson y Jeney, 1992; Jeney, 1997; Sakai, 1999; Sahoo y Mukherjee, 2002) y parasitarias, producidas por el protozoo *Ichthyophthirius multifiliis* (Kumari y Shaoo, 2006). Asimismo, en lubina (*Dicentrarchus labrax*) se ha encontrado un aumento en la actividad fagocítica con dietas suplementadas con una mezcla de levamisol y β -glucanos. Igualmente, la actividad del complemento y de la lisozima mejora en lubinas (*Dicentrarchus labrax*) alimentadas con dietas suplementadas con β -glucanos a partir de levaduras, vitamina C y vitamina E (Bagni y col., 2005).

Dentro de los inmunoestimulantes se encuentran los llamados prebióticos. Estas sustancias se definen por regla general como ingredientes dietéticos formados por hidratos de carbono no digeribles. Asimismo, son alimentos que estimulan el crecimiento y la actividad de bacterias beneficiosas al organismo. Su principal función reside en el cambio potencial de la comunidad bacteriana intestinal a una dominada por bacterias beneficiosas, lo que favorece la inhibición de la colonización de organismos patógenos (Manning y Gibson, 2004).

El uso de prebióticos en acuicultura es muy reciente si lo comparamos con estudios realizados en otras especies terrestres. Entre los prebióticos evaluados en peces tenemos la inulina, fructo oligosacáridos (FOS), fructo oligosacáridos de cadena corta, manano oligosacáridos (MOS), galacto oligosacáridos (GOS), xylooligosacáridos (XOS), arabinoxilo oligosacáridos (AXOS), isomalto oligosacáridos (IMO) y Grobioitc–A.

Así, tenemos que los MOS son utilizados porque actúan como inhibidores de la unión de patógenos a las células epiteliales del intestino (Montero y col., 2005). Igualmente, en lubinas (*Dicentrarchus labrax*) se puede ver cómo la alimentación con MOS mejora la supervivencia de los peces frente a una infección con *V. alginolyticus* (Torrecilla y col., 2007).

En la siguiente tabla detallamos algunos de los inmunoestimulantes estudiados en los últimos años en peces.

Tabla V.- Inmunoestimulantes estudiados en peces

INMUNOESTIMULANTE	ESPECIE	REFERENCIA
Ajo	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Nya y Austin, 2011
Glucanos, vitamina E y vitamina C	<i>Thunnus maccoyii</i>	Kirchhoff y col., 2011
Ergosan	<i>Oreochromis niloticus</i>	Merrifield y col., 2011
Alginato de sodio	<i>Epinephelus coioides</i>	Yeh y col., 2008
MOS	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Staykov y col., 2007
Lactoferrina, Glucanos y Lectina	<i>Catla catla</i>	Kamilya y col., 2006
Lactoferrina, Levamisol y Glucanos	<i>Ictalurus punctatus</i>	Kumari y Sahoo, 2006
Quitina, chitosan y levamisol	<i>Cyprinus carpio</i>	Gopalakannan y Arul, 2006
Macrogard, Ergosan y Glucanos	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Bagni y col., 2000 y 2005
β -Glucanos	<i>Oreochromis niloticus</i>	Whittington y col. (2005)
Glucanos + Manosa	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Honda, 2004
Astaxantina, vitamina E, vitamina C y arginina	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Galindo-Villegas y col., 2002
Vitamina E	<i>Sparus aurata</i>	Cuesta y col., 2002
Levadura, α -tocoferol y vitamina C	<i>Sparus aurata</i>	Ortuño y col., 2001 y 2003
Nucleótidos y β -glucano	<i>Salmonidae</i>	Burrells y col., 2001
Quitina	<i>Sparus aurata</i>	Esteban y col., 2001
Lactoferrina	<i>Cyprinus carpio</i>	Kakuta, 1998
Vitamina C	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Sakakura y col., 1998
Vitamina E	<i>Scophthalmus maximus</i>	Pulsford y col., 1995
Vitamina C	<i>Cyprinus carpio</i>	Yano y col., 1989
Vitamina C	<i>Salmo salar</i>	Hardie y col., 1991

II.7.- PROBIÓTICOS EN ACUICULTURA

El uso de probióticos no es algo novedoso ya que su utilización se realiza desde la antigüedad, primero en humanos, animales terrestres, y recientemente, en acuicultura. El estudio de bacterias beneficiosas en humanos es muy amplio, y hace más de un siglo, Elie Metchnikoff en 1907, postuló que las bacterias ácido lácticas (BAL) ofrecían beneficios a la salud y llevaban a la longevidad. Sugirió así que la autointoxicación intestinal y el envejecimiento resultante podría suprimirse modificando la microbiota intestinal utilizando microbios útiles para sustituir a los microbios proteolíticos como *Clostridium*, desarrollando así una dieta con leche fermentada por la bacteria a la que denominó bacilo búlgaro (Underdown, 1986).

La palabra probiótico se origina de 2 vocablos griegos “*pro*” y “*bios*” que significan “*para la vida*”. Dicho término fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell. A diferencia de los antibióticos, se definió al probiótico como aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos. Posteriormente la palabra probiótico fue aplicada para referirse a extractos de tejido que estimulan el crecimiento bacteriano (Sperti, 1971). Sin embargo, Parker (1974) fue el primero en utilizar el término probiótico de acuerdo a las definiciones actuales “*organismos o sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal*”.

Fuller (1989) enfatizó en el requisito de viabilidad para los probióticos e introdujo la idea de que tienen un efecto beneficioso para el hospedador mejorando su equilibrio intestinal. Por otra parte, los probióticos también se definen como células microbianas que una vez suministradas entran al tracto gastrointestinal y se mantienen vivas contribuyendo a mejorar la salud de los animales (Gatesoupe y col., 1999).

Hasta la fecha se han ofrecido muchas definiciones sobre los probióticos, pero una de las más completas en la que se incluye la importancia de la microbiota es la propuesta por Verschuere y col. (2000a), donde se define a un probiótico como “*suplemento vivo microbiano que tiene efectos beneficiosos en el hospedador modificando la flora asociada al mismo y la flora asociada al ambiente*”. Más tarde, Reid y col. (2003) modifica esta definición incluyendo la frase “*cuando son administradas en cantidades adecuadas confieren un beneficio saludable para el hospedador*”. Una definición más reciente es la ofrecida por Salminen y col. (2005), que sugiere que los probióticos pueden ser parte de la microbiota gastrointestinal saludable, y que su adición puede ayudar a devolver a la normalidad una microbiota alterada.

La mayoría de estas definiciones hacen referencia al hombre y a mamíferos ya que es en ellos donde se han realizado la mayor parte de los estudios sobre los efectos de los probióticos. Por lo tanto, se deben tener en cuenta ciertas consideraciones antes de aplicarlas en acuicultura debido a que en animales acuáticos la microbiota depende del medio con el cual está en constante interacción, siendo este medio, la dieta y la edad los responsables de la misma, llegando ésta a ser estable en la etapa adulta del animal (Cahill, 1990).

La aplicación de probióticos en acuicultura está relacionada con el control biológico frente a enfermedades infecciosas, la supervivencia, el aumento del crecimiento y la actividad enzimática, la mejora de la respuesta inmunitaria frente al estrés y la mejora de la calidad del agua. Los probióticos comúnmente usados en acuicultura, pertenecen a diferentes grupos como las bacterias ácido lácticas y los Géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Roseobacter*. Asimismo, aunque de menor interés los Géneros *Aeromonas*, *Alteromonas* y *Flavobacterium*, al igual que algas unicelulares y levaduras (Ringo y col., 2010).

II.7.1.-Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos Gram positivos muy heterogéneos desde el punto de vista morfológico y fisiológico. Este grupo comprende alrededor de 20 géneros del *Phylum Firmicutes*, siendo los Géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* los más importantes (Holzapfel y col., 2001; Axelsson, 2004).

Una de las principales características de este grupo de bacterias es la producción de ácido láctico como producto final de la fermentación de hexosas. Estas bacterias presentan dos tipos de metabolismo, el homofermentativo (solo produce ácido láctico) y el heterofermentativo (además del ácido láctico, produce ácido acético, etanol y dióxido de carbono) (Torres, 1999).

En general, este grupo de bacterias se caracterizan por ser microorganismos de morfología bacilar o cocoide, ácido tolerante, no esporulados, microaerófilos o anaerobios facultativos, y por carecer de las enzimas citocromo oxidasa y catalasa. Estas bacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza debido a su buena capacidad de adaptación, localizándose frecuentemente en hábitats ricos en nutrientes, como carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas (Rojas y Vargas, 2008). Algunas bacterias de este grupo las podemos encontrar en productos alimentarios, siendo además habitantes comunes del tracto gastrointestinal y mucosas de humanos y animales terrestres, estiércol, aguas residuales urbanas e industriales (Cintas y col., 2000), así como también del tracto gastrointestinal de peces, mayoritariamente de agua dulce. Además, las bacterias ácido lácticas tienen gran interés por referirse a un grupo

bacteriano relacionado de forma excelente con altos niveles de salud (Naiud y col., 1999; Gatesoupe, 2008).

II.7.2.- Funciones de la microbiota natural en los organismos vivos

La microbiota intestinal juega un papel importante e influye de manera directa sobre la nutrición y salud de los animales, por lo que su alteración afecta el estatus fisiológico de los organismos incluyendo la inmunidad, crecimiento, desarrollo general y la calidad final del producto. La microbiota en animales acuáticos no existe como una entidad absoluta, sino que hay una interacción constante entre el ambiente y el pez, de tal forma que los peces y los microorganismos comparten el mismo ecosistema (Al-Harbi y Uddin, 2005).

El desarrollo de la microbiota es un proceso gradual que comienza después del nacimiento. En animales terrestres, la microbiota materna es la fuente inicial de colonización bacteriana, mientras que en animales acuáticos, esta acción está determinada por su contacto con el medio ambiente circundante, e influida por la ingesta de alimento, la secreción de hormonas y la absorción de nutrientes, así como la presencia de proteínas y enzimas digestivas. Inicialmente, cepas anaeróbicas facultativas dominan el intestino y posteriormente la variabilidad poblacional dependerá del tipo de dieta ingerida, la edad, la ubicación geográfica, tratamientos diversos, y el estado general del organismo (Cahill, 1990; Isolauri y col., 2001).

La microbiota presenta funciones metabólicas, tróficas y protectoras. La función metabólica tiene como finalidad ayudar en los procesos de digestión y absorción de nutrientes para proporcionar energía al organismo, mientras que la función trófica fomenta el crecimiento y la diferenciación celular, además de estimular el sistema inmune del organismo. En cambio, la función protectora se desarrolla desde el nacimiento, ya que actúa como la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos exógenos u oportunistas, creando el efecto barrera.

Asimismo, la mucosa intestinal provee al individuo de protección contra la constante presencia de antígenos provenientes del alimento y de microorganismos presentes en el ambiente circundante (Isolauri y col., 2001; Shiffrin y Blum, 2002). Por otro lado, Rawls y col. (2004) demostraron que la microbiota en peces puede regular más

de 200 genes de expresión en el tracto digestivo, controlando la proliferación bacteriana en el intestino, el desarrollo metabólico de los nutrientes y la respuesta inmune innata.

Es importante conocer la microbiota de los animales de cultivo y el efecto que podrían tener diferentes factores sobre la misma. Este conocimiento nos permitiría establecer nuevas estrategias para el manejo de las enfermedades, partiendo del criterio de prevenirlas inicialmente, y posteriormente tratarlas. Por tal motivo, la utilización de bacterias antagónicas de microorganismos patógenos en sistemas de cultivo ha despertado últimamente un enorme interés por muchos investigadores. En este sentido, los probióticos se presentan como una alternativa potencial y efectiva, tanto como promotores del crecimiento, o como protectores frente a enfermedades infecciosas. En general, a nivel experimental son muchas las cepas probióticas utilizadas como herramientas útiles para mejorar la producción y el estado de salud de los peces (Nikoskelainen y col., 2001a; Kesarcodi-Watson y col., 2008; Dimitroglou y col., 2011).

II.7.3.- Criterios de selección de una cepa probiótica

En acuicultura, la selección de cepas probióticas es un proceso bastante complejo ya que el hábitat microbiano está sometido a constantes alteraciones, y permite cambios en la composición estructural y funcional de las comunidades microbianas debido a su interacción con el medio ambiente (Verschuere y col., 2000a). Algunas investigaciones sugieren que los probióticos deben ser seleccionados del propio hospedador en los cuales van a ser usados, y de esta manera, minimizar los efectos provocados por las diferencias entre los ambientes en que se desarrollan los organismos (Duwat y col., 2000), aunque existen trabajos donde se ha demostrado el efecto beneficioso de bacterias aisladas de otros hospedadores sobre la salud de los peces (Gatesoupe, 2008).

En general, para que una cepa sea considerada como cepa probiótica, debe cumplir una serie de características:

- **Poseer efecto antagonista frente a diferentes patógenos.**- Esta es una vía muy común para la primera selección de los posibles probióticos, donde los patógenos son expuestos *in vitro* a los patógenos seleccionados, o a sus productos extracelulares. Dicho efecto puede evaluarse en medio líquido o en sólido (Verschuere, 2000a; Chang y Liu, 2002; Irianto y Austin, 2002).

- **Resistencia al pH y a la bilis.-** Es importante analizar inicialmente si la cepa probiótica candidata seleccionada tiene capacidad de llegar viva al intestino, mantenerse y proliferar de manera eficiente una vez ha sido ingerida y poder observar su efecto a largo plazo, o en su defecto ser adicionada regularmente en la dieta (Duwat y col., 2000; Nikoskelainen y col., 2001b).
- **Inocuidad.-** Una cepa probiótica debe estar exenta de patogenicidad y ser incapaz de ocasionar daño al receptor, además de ofrecer efectos beneficiosos en la interacción con el mismo (Irianto y Austin, 2002).
- **Capaz de adherirse a células intestinales.-** Para sobrevivir y competir en un ecosistema complejo como el intestino, es necesario que la cepa seleccionada pueda adherirse a la mucosa intestinal, siendo este criterio importante a la hora de evaluar una cepa como probiótica, ya que solo las cepas capaces de adherirse podrían llegar a colonizar el intestino, y a su vez formar parte de la primera barrera defensiva de los peces frente a patógenos. En caso contrario la cepa se convertirá en un organismo transitorio, limitando sus posibles efectos positivos (Verschuere y col., 2000b; Vine y col., 2006).

II.7.4.- Mecanismo de acción de los probióticos

Los diferentes modos de acción de las cepas probióticas están muy bien documentados a través de diferentes publicaciones que existen actualmente en la bibliografía. El efecto beneficioso de estas bacterias, dependerá de la exactitud con la que lleguen al lugar específico donde deben actuar. La capacidad de estas cepas para ejercer su acción protectora en el hospedador está relacionada con sus diferentes mecanismos de acción, que son evaluados tanto *in vitro* como *in vivo*, y se detallan a continuación:

II.7.4.1.- Producción de compuestos inhibidores

En la naturaleza, la producción de compuestos antibacterianos bactericidas o bacteriostáticos es muy común entre las bacterias y hongos. De todos ellos, solo algunos presentan un amplio espectro de acción y son utilizados en el control de agentes patógenos. La presencia de microorganismos que producen sustancias inhibitorias en el intestino

constituye una barrera contra la proliferación de patógenos oportunistas (Naiud y col., 1999).

En general, el efecto antimicrobiano de las bacterias es debido a la producción de compuestos antimicrobianos como, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, alteración del pH por la producción de ácidos orgánicos de cadena corta y diacetilo (Verschuere y col., 2000a; Vine y col., 2006).

a) Bacteriocinas

Entre los principales compuestos antimicrobianos producidos por microorganismos encontramos las bacteriocinas. Las bacteriocinas son metabolitos peptídicos de síntesis ribosomal, que pueden sintetizar la mayoría de los microorganismos, siendo la Nisina y Pediocina, producidas por las BAL las que despiertan mayor interés por ser las más utilizadas en el procesamiento y conservación de alimentos, como probióticos en humanos, animales terrestres y últimamente en animales acuáticos. Estos agentes antimicrobianos específicos ejercen su actividad letal a través de receptores definidos localizados en la superficie externa de la bacteria, seguida de cambios metabólicos, fisiológicos y morfológicos que trae como consecuencia la muerte del patógeno (Havarstein y col., 1996). Estas bacteriocinas se clasifican en varios grupos de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas (Kemperman y col., 2003).

- **Clase I Lantibióticos.-** Son péptidos pequeños poli cíclicos (<5 KDa) con poca estabilidad al calor y con aminoácidos modificados. Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la Nisina, producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.
- **Clase II No Lantibióticos.-** Son péptidos lineales y no modificadas de pequeño tamaño (<10 KDa) y termoestables. El representante más estudiado de este grupo es la Pediocina producida por *Pediococcus acidilactici*.
- **Clase III.-** Bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 KDa) y termolábiles, siendo las más conocidas en este grupo la Helveticina y Lactacinas A y B. Ejemplos de ellos tenemos a *Lactobacillus helveticus*, y *Lactobacillus jhonsonni*, respectivamente.

- **Clase IV.-** Bacteriocinas complejas, constituidas por una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas, llamadas también glicoproteínas. En esta clase se incluye la Lactocina S o Mesenterocina.
- **Clase V.-** Bacteriocinas de estructura celular no modificada postraducción. A esta clase pertenecen la Enterocina AS-48 y la Gasericina A.

Por lo general, en la naturaleza existe una enorme diversidad de bacteriocinas, y han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas. Actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de pequeños compuestos, o alterando la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácidos nucleicos (Chikindas y col., 1993; Montville y Chen, 1998). Existen multitud de estudios acerca de la actividad inhibitoria producida por bacterias ácido lácticas mediante la producción de bacteriocinas (Klenhamer, 1993). Géneros como *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus lactis* producen generalmente la bacteriocina Nisina. Otros géneros como *Enterococcus* producen Enterocina (A, B, I, L, o P), *Carnobacterium* sp. produce Divercina y Piscicocina, *Pediococcus* sp. la Pediocina y la bacteriocina ALP 57. Asimismo, *Lactobacillus* sp. puede producir Sakacina, Curvacina, o Plantaricina. Todos estos géneros bacterianos han sido ampliamente utilizados a nivel experimental como probióticos en animales acuáticos por inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (Campos y col., 2006; Motta y Brandelli, 2008; Desriac y col., 2010).

b) Peróxido de hidrógeno

En la naturaleza, la mayor parte de las bacterias catalasa negativas, producen peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en presencia de oxígeno libre, pero las más estudiadas pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas, las cuales utilizan el oxígeno para formar peróxido mediante la flavoproteína oxidasa o peroxidasas, que es liberada al medio, siendo altamente tóxico para otras bacterias que comparten el mismo hábitat, y a su vez, eliminadas del tracto digestivo (Bruno y Montville, 1993; Bjorn y col., 2003). Asimismo, el peróxido de hidrógeno puede inhibir o destruir bacterias por medio de la inactivación de enzimas. El efecto bactericida del H_2O_2 se atribuye a su potente poder oxidante en la célula bacteriana y a la destrucción de estructuras moleculares básicas de las proteínas (Dahiya y Speck, 1968; Price y Lee, 1970; Kontchou y Blondeau, 1990; Hyuk y col., 2008).

c) Alteración del pH por la producción de compuestos orgánicos de cadena corta

La mayoría de los microorganismos presentan gran versatilidad metabólica, pudiendo presentar requerimientos oxidativos o fermentativos para su crecimiento, y dependiendo de su metabolismo pueden producir o no metabolitos secundarios. Algunas levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Debaryomyces hansenii*) y bacterias, en su mayoría ácido lácticas, son evaluadas como probióticos en acuicultura por ser consideradas inocuas y por su gran capacidad fermentativa, produciendo cantidades significativas de ácidos orgánicos de cadena corta (ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico y etanol) a partir de carbohidratos simples, lo cual produce un aumento en la acidez intestinal que limita el crecimiento de bacterias patógenas (Ten Brink y col., 1987; Mombelli y Gismondo, 2000; Klewicki y Klewicka, 2004; Balcázar y col., 2007). Estos ácidos causan cambios del pH intracelular que son altamente tóxicos para los microorganismos porque atraviesan la membrana bacteriana en forma no ionizada y se acumulan en forma ionizada en el interior de la célula (Aguirre, 1993). Y así, por ejemplo, algunos estudios *in vitro* han demostrado que el ácido acético y el ácido láctico son los responsables de la disminución del crecimiento de *Carnobacterium piscícola*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio pelagius* y *Vibrio splendidus* (Vázquez y col., 2005a).

Por otra parte varias especies del Género *Bifidobacterium*, utilizadas como probióticos en humanos, han sido evaluadas *in vitro* por producir un fuerte efecto inhibitorio frente a *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*. En ese estudio se ha comprobado que la actividad inhibitoria es debida a la producción de ácidos orgánicos de cadena corta, en particular ácido láctico y acético (Makras y Vuyst., 2006).

d) Diacetilo

Algunos géneros bacterianos como *Enterococcus* pueden producir diacetilo a partir del citrato siguiendo la vía del piruvato, que es el metabolito intermediario. Este compuesto, que es producido en la fermentación no ácida, presenta un potente efecto inhibitorio frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos, siendo muy utilizado en la industria alimenticia (Vallejo y col., 2008).

II.7.4.2.- Competición por energía disponible o por compuestos químicos

La energía disponible y los compuestos químicos son factores que determinan la coexistencia y dominancia de las distintas poblaciones microbianas en un mismo

ecosistema (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981). En un ecosistema abierto como el de los peces, entre los microorganismos existe competencia por los nutrientes que hay en el medio y por la energía que pudiera obtenerse de estos. El compuesto químico más importante para la mayoría de los microorganismos es el hierro, y su captación es a través de sideróforos, por lo que privándoles de este elemento se podría inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables cuya virulencia dependa de la disponibilidad de hierro para su crecimiento (Sullivan, 2001).

El carbono es otro elemento que necesitan los microorganismos para su metabolismo. En la microbiota intestinal de los peces predominan organismos heterotróficos que compiten por sustratos orgánicos como el carbono, pero se necesita un mayor conocimiento de los factores que rigen la microbiota para su manipulación (Verschuere y col., 2000b).

Un ejemplo de este mecanismo es el efecto inhibitorio que ejerce *Pseudomonas fluorescens* en co-cultivo frente a *Aeromonas salmonicida* y *V. anguillarum* (Smith y Davey, 1993; Gram y col., 1999). Bacterias inocuas que compitan por nutrientes esenciales podrían ser utilizadas como probióticos para competir con patógenos que necesiten de estos compuestos para su crecimiento (Gatesoupe y col., 1997; Sullivan, 2001). Pero el uso de estas bacterias debe ser analizado con precaución, ya que pueden causar efectos adversos como la inducción de la expresión de sideróforos en el patógeno, favoreciendo así el desarrollo de este último en el hospedador (Gram y col., 2001).

II.7.4.3.- Competición por lugares de fijación

En humanos, un mecanismo para prevenir la colonización intestinal de bacterias patógenas es la competición por lugares de fijación. Y parece ser que este mecanismo es similar en peces (Salminen y col., 1996; Gill, 2003). Así, el establecimiento de la microbiota es un componente clave para promover la salud de los animales por mecanismos competitivos (Tapia-Paniagua y col., 2010). La mucosa intestinal en los peces representa uno de los principales lugares en los que las bacterias presentes en el medio ambiente interactúan con la microbiota intestinal, y así, los tejidos linfoides asociados al intestino desarrollan mecanismos para diferenciar entre los microorganismos patógenos y comensales (Pérez y col., 2010).

La habilidad para la adhesión y posterior colonización de bacterias beneficiosas al mucus intestinal forma la primera barrera de defensa contra la proliferación de bacterias patógenas invasoras. Este fenómeno se conoce como exclusión competitiva, y si esto no se lleva a cabo, las bacterias beneficiosas se consideran como microorganismos en tránsito y se eliminan junto con las heces sin haber ejercido su función probiótica de manera adecuada. Debido a esto, este mecanismo se considera como un pre-requisito para seleccionar una cepa como probiótica (Olsson y col., 1998; Jöborn y col., 1997; Gatesoupe y col., 1999; Nikoskelainen y col., 2001b).

Este mecanismo de adhesión y posterior exclusión de patógenos puede estar basado en factores físico-químico como la hidrofobicidad, o factores específicos donde intervienen las adhesinas que se unen a células receptoras presentes en el epitelio intestinal, y que están presentes en la superficie de las cepas probióticas (Salminen y col., 1996). En los peces la capacidad de adhesión *in vitro* de bacterias con capacidad probiótica y la capacidad de excluir patógenos han sido evaluadas por varios autores en diferentes cepas probióticas (Nikoskelainen y col., 2001b; Namba y col., 2007; Van de Marel y col., 2008; Balcázar y col., 2009; Vendrell y col., 2009).

II.7.4.4.- Aumento de la respuesta inmune

Los inmunoestimulantes utilizados son compuestos químicos o microorganismos ya sean viables o no, que actúan aumentando el sistema defensivo del hospedador, provocando que los animales estén más preparados y resistan mejor a infecciones causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos (Raa y col., 1996).

El sistema inmune de los peces presenta dos tipos de respuesta, la innata y la adquirida. La respuesta inmune innata o sistema de defensa no específico está formado por una serie factores humorales solubles (mucus, proteínas, etc), células citotóxicas inespecíficas y células fagocíticas, y constituyen la primera barrera defensiva de los peces frente a los patógenos. La segunda línea de defensa de los peces es la inmunidad adquirida o respuesta inmune específica, pudiendo ser una respuesta celular y/o humoral, basada en una serie de cambios adaptativos que tiene lugar dentro de las poblaciones linfoides (linfocitos T y B).

Muchos de los inmunoestimulantes usados en acuicultura como probióticos son bacterias vivas o inactivadas, esporas, y componentes de la pared celular de bacterias y levaduras (Irianto y Austin, 2002). Estas sustancias tienen un efecto positivo en las funciones que regulan el sistema inmune del hospedador, debido a que las alteraciones de estas funciones por un desequilibrio en la microbiota pueden contribuir al desarrollo de enfermedades (Pérez y col., 2010).

Recientemente, el uso de animales gnotobióticos (libres de patógenos) ha demostrado que las bacterias tienen un impacto profundo sobre la anatomía, fisiología, y desarrollo inmunológico del hospedador (Rawls y col., 2004). Existen diversos trabajos que demuestran que el sistema inmune de peces y crustáceos puede ser estimulado por bacterias probióticas (Sakai, 1999; Nayak, 2010). A continuación, señalamos algunos ejemplos:

- En cultivo de dorada (*Sparus aurata*), estudios *in vitro* demuestran que la utilización en la dieta de una mezcla de vibrios (Pdp11 y 51M6), algunos miembros del Género *Bacillus* y una cepa de *Shewanella* spp. inactivados por calor, tiene un efecto inmunoestimulador modulando el sistema inmune innato en los peces (Díaz-Rosales y col., 2006; Salinas y col., 2006).
- En trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), la utilización de varias cepas probióticas como *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus sakei* administrada en la dieta durante 2 semanas, activó el sistema inmune y protegió a los peces frente a enfermedades bacterianas como la lactococosis y la forunculosis, mostrando porcentajes de supervivencia entre 97-100% (Irianto y Austin, 2002; Nikoskelainen y col., 2003; Balcázar y col., 2007; Brunt y col., 2007; Vendrell y col., 2007).
- En larvas de lubinas (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Sparus aurata*) y mero (*Epinephelus coioides*), alimentadas con cepas probióticas (*Bacillus* sp.) se ha podido observar una estimulación temprana de su sistema inmune, cambios fisiológicos, y la modificación de su microbiota intestinal (Abelli y col., 2009; Sun y col., 2010).

- En lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) se ha estudiado el efecto protector de la administración de dos productos comerciales (Lactobacil® y Sporolac®), demostrando que la utilización de éstos en la dieta, aumentan parámetros inmunes como la actividad fagocítica, producción de peroxidasa y además protege un 65-70% a los peces frente a la enfermedad linfocítica, comparado con el grupo no tratado que alcanzaron una mortalidad del 80% (Harikrishnan y col., 2010).

- En camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) se ha evaluado una cepa de *Bacillus* sp., administrada en la dieta durante 28 días, frente a una infección con el virus de la mancha blanca, demostrando un aumento de la respuesta inmune de estos crustáceos y una mayor resistencia a la enfermedad (Li y col., 2009; Zhou y col., 2009).

II.7.4.5.- Mejora de la calidad del agua

Muchos estudios señalan que mejorar la calidad de agua en los sistemas de cultivo mediante la adición de cepas probióticas es un factor importante para mantener el bienestar del hospedador. Varios miembros de los Géneros *Bacillus* y *Phenibacillus* son utilizados como bacterias “biorremediadoras”, convirtiendo la materia orgánica en CO₂ (Antony y Philip, 2006).

Asimismo, existen muchos estudios donde se utilizan géneros como *Nitrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas* y *Rhodopseudomonas* en cultivo de peces y crustáceos, proporcionando un impacto favorable sobre el medio (Verschuere y col., 2000b; Zhou y col., 2010).

Muchas de estas bacterias nitrificantes, son utilizadas para controlar los niveles de amoníaco y nitritos en tanques o acuarios, debido a que estos compuestos son un problema de enorme trascendencia para diferentes cultivos (Lewis y Morris, 1986; Chen y Chen, 2001; Lee y col., 2002; Wang y col., 2004; Wang y Han, 2007).

II.7.4.6.- Contribución enzimática para la digestión

Varios estudios han descrito el efecto nutricional de algas, cepas probióticas y levaduras sobre el sistema digestivo de peces y crustáceos, mejorando su crecimiento, supervivencia y asimilación de nutrientes (Askarian y col., 2011). Estudios *in vitro* han evaluado que bacterias aisladas del propio sistema digestivo de los peces aumentan la

actividad enzimática de su hospedador, produciendo un efecto positivo sobre la digestión de proteínas, almidón y lípidos (Gatesoupe y col., 1997). Otros ensayos realizados con larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) alimentados con levadura viva (*Debaryomyces hansenii*) mostraron un incremento en la actividad enzimática y concentración de tripsina y lipasas mediante el mRNA, sugiriendo la maduración temprana del sistema digestivo de las larvas (Tovar y col., 2004).

Por otra parte, también se ha descrito una alta tasa de crecimiento en lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) tras la administración en la dieta de las cepas probióticas Pdp11 y Pdp13 liofilizadas (Sáenz de Rodrigáñez y col., 2009). Asimismo, recientes avances sobre nutrición acuícola nos revelan que el uso de cepas de *Leuconostoc* sp. suplementados en la dieta durante 50 días, aumentan la actividad enzimática del intestino, además de ayudar al crecimiento y supervivencia en esturión (*Acipenser persicus*) en su fase larvaria (Askarian y col., 2011).

II.7.4.7.- Fuente de macro-micro nutrientes

Otro mecanismo de acción de las cepas probióticas puede ser el aporte de nutrientes. Estas bacterias pueden producir varias vitaminas como metabolitos secundarios, y entre ellas, la vitamina B₁₂ es la más analizada. Esta vitamina ha sido aislada de microorganismos presentes en el intestino de una gran variedad de peces, como la carpa (*Cyprinus carpio*), tilapia (*Oreochromis niloticus*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Sugita y col., 1990) y bagre de río (*Ictalurus punctatus*) (Limsuwan y Lovell, 1981), sugiriendo que si estas bacterias que producen vitaminas están en los peces, no necesitarían su administración en la dieta (Sugita y col., 1991).

La vitamina C es importante para la formación de los cartílagos y tejido fibroso en los peces, pero debe ser adicionada en la dieta ya que no hay datos que demuestren la producción de esta vitamina por parte de microorganismos intestinales, al contrario de lo que ocurre con la vitamina K que puede ser proporcionada por la propia microbiota intestinal, como se ha demostrado en truchas de río (*Salvelinus fontinalis*), contribuyendo así estas bacterias en la dieta de estos peces (Poston, 1964).

Sabemos que los carotenoides actúan como antioxidantes en los tejidos de los peces compactando los lípidos dañados por radicales libres. La selección de cepas que produzcan

diversos pigmentos (amarillo o naranja brillante) sobre medios de cultivo, puede ser un primer paso para la utilización de estas bacterias como potenciales probióticos, partiendo de la base de que estos microorganismos sean inocuos, y que tengan la habilidad de producir estos metabolitos beneficiosos (Holmstrom y col., 2002).

Además, se sabe que ciertos lípidos producidos por microorganismos probióticos han contribuido significativamente a la dieta de la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*) alterando físicamente la morfología de su sistema digestivo (Vine y col., 2006).

II.7.5.- Los probióticos como preventivo de enfermedades en Acuicultura

La manipulación microbiana es una herramienta viable para reducir o eliminar la incidencia de enfermedades y su utilización está ampliamente demostrada, constituyendo así, una buena alternativa de la sustitución de agentes quimioterapéuticos para el control de las mismas.

En la actualidad se ha incrementado la búsqueda de microorganismos con capacidad probiótica con el fin de mejorar el rendimiento en los sistemas de producción, bajo el término de cultivos respetuosos con el medio ambiente (Gatesoupe y col., 1999). Las investigaciones sobre probióticos en acuicultura son muy recientes, ya que no llega a cuatro décadas el momento en el que se iniciaron los primeros estudios. Desde entonces, los probióticos comúnmente usados en acuicultura, incluyen un amplio rango de géneros bacterianos como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Roseobacter* y *Zooshikella*, aunque levaduras, bacteriófagos y algas unicelulares también han sido utilizadas con mucho éxito en cultivos de peces, moluscos y crustáceos (Irianto y Austin, 2002; Ringo y col., 2010).

Algunas algas unicelulares como *Thalassboacter utilis* y *Skeletonema costatum* forman parte del fitoplancton comúnmente utilizado en larvicultura de moluscos y crustáceos. Estas algas producen sustancias tóxicas que inhiben el crecimiento de *Vibrio anguillarum* (Nogami y Maeda, 1992; Naviner y col., 1999).

Los bacteriófagos son las comunidades más abundantes de la biósfera y se ha estimado que existen 10^{10} fagos por cada litro de agua de mar, lo que representa un excelente mecanismo de control de las bacterias marinas, equilibrando las poblaciones microbianas en el medio (Ronda y col., 2003). Recientemente, investigadores japoneses han puesto a punto métodos que permiten evaluar la capacidad de los fagos como agentes terapéuticos en acuicultura. Se han hecho ensayos con riñones de peces infectados, donde se ha podido observar la muerte de bacterias en su hábitat natural en presencia de fagos, lo que supondría una mayor supervivencia de los peces infectados por bacterias patógenas (Nakai y Park, 2002).

Hasta el momento, la mayoría de los trabajos con fagos se han centrado en el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por *Lactococcus garvieae* y han sido evaluadas en especies como el ayu (*Plecoglossus altivelis*) o medregal (*Seriola quinqueradiata*). Actualmente hay identificados 14 fagos diferentes de *L. garvieae* pero los más utilizados son PLgY y PLgW (Nakai y col., 1999).

Hoy en día, las cepas seleccionadas como probióticos son administradas en dietas artificiales, en alimento vivo (artemia y rotíferos) o en agua de cultivo, habiendo sido probados en diferentes colectivos de animales acuáticos como peces, moluscos, crustáceos, equinodermos y mamíferos marinos, con diferentes tamaños y pesos. Asimismo, los probióticos han sido utilizados en acuariofilia, como es el caso de *Lactobacillus rhamnosus* en larvas de pez payaso (*Amphiprion ocellaris*) donde el uso de esta bacteria se analiza mediante técnicas moleculares, y se puede observar aceleración en la metamorfosis de los peces, aumento de peso y mejor crecimiento, además de un mejor desarrollo esquelético de la cabeza, junto con una marcada disminución al estrés (Avella y col., 2010).

Se han evaluado varias cepas probióticas respecto al nivel de protección de los peces frente a enfermedades bacterianas. Así tenemos que la cepa *Pseudomonas fluorescens* AH2 protege a la trucha arcoíris frente a una infección con *V. anguillarum*, mostrando una reducción relativa de la mortalidad del 43% si comparamos los animales tratados (27% mortalidad) con el grupo control (47% mortalidad). En la misma especie, *Aeromonas sobria* y *Bacillus* sp. fueron utilizados para el control de la lactococosis, estreptococosis, vibriosis, forunculosis y la enfermedad de la boca roja, produciendo una reducción en la mortalidad desde valores del 75-100% hasta el 0-16% (Gram y col., 1999;

Brunt y Austin 2005; Brunt y col., 2007; Abbass y col., 2010). *Zooshikella* sp. ha sido evaluada para el control de estreptococosis en lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), mostrando mortalidades del 40% para los peces infectados con *Streptococcus* y que fueron previamente alimentados con esta cepa, comparados con el grupo control, que no recibió el probiótico donde la mortalidad fue del 85% (Kim y col., 2010).

Bacillus circulans PB7 fue probada en carpa catla (*Catla catla*) frente a una exposición por baño con *Aeromonas hydrophila* con porcentajes de supervivencia del 96,66%, comparados con el 6,66 % del grupo control (Bandyopadhyay y Mohapatra, 2009). En tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) se evaluó la mezcla de 2 cepas probióticas, *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis*, mostrando los peces una supervivencia del 36,84% frente a una infección con *Aeromonas hydrophila* y un 32,88% frente a *Streptococcus iniae*, comparado con el 100% de mortalidad en el grupo infectado que no recibieron tratamiento probiótico previo (Aly y col., 2008).

En juveniles de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) alimentados con dos cepas del Género *Shewanella*, se pudo observar entre un 27,5% y un 32,5% de supervivencia, frente a una infección experimental con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, comparado frente al grupo control que mostró entre un 65-75% de mortalidad (García de la Banda y col., 2010). Frente a la vibriosis, causada por *V. anguillarum*, se ha evaluado la cepa bacteriana Kocuria SM1. Una dosis de 10^8 unidades formadoras de colonia (ufc) por gramo de alimento, protege entre un 15% y un 20% frente a la enfermedad en trucha arcoíris, comparada con el 74-80% de mortalidad que se manifestó en el grupo control que no recibió previamente el tratamiento probiótico (Sharifuzzaman y Austin, 2009 y 2010).

Hoy en día, existen en el mercado varios productos probióticos, pero solo el Bactocell® (*Pediococcus acidilactici*) está aprobado por la Unión Europea para ser utilizado en la acuicultura de salmónidos y crustáceos. Como hemos mencionado anteriormente, un amplio grupo de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, junto a otros microorganismos, han sido evaluados como probiótico, pero todos los beneficios esperados de estas cepas probióticas difieren mucho entre las especies susceptible a su uso (peces o crustáceos de agua dulce, salobre o marina), el estado del cultivo (larva, juvenil, reproductores) y el sistema de cultivo (flujo continuo o recirculación, tanques, estanques o jaulas). Por otra parte, la forma de aplicación y la

gestión de las instalaciones (apropiadas medidas de bioseguridad, renovación del agua, químicos, etc) podrían afectar al rendimiento, pero también la supervivencia o permanencia de los microorganismos en el ambiente de cultivo y/o el hospedador.

A continuación se detallan las cepas bacterianas, alóctonas o autóctonas más utilizadas en acuicultura, que han sido aisladas de diversas fuentes, y probadas en peces, (Tabla VI), moluscos y equinodermos (Tabla VII), crustáceos (Tabla VIII) y alimento vivo (Tabla IX).

Tabla VI.- Probióticos utilizados en peces

CEPAS PROBIÓTICAS	ESPECIE DE PEZ	REFERENCIA
<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Scophthalmus maximus</i>	García de la banda y col. (1992)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Scophthalmus maximus</i>	García de la banda y col. (1992)
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Scophthalmus maximus</i>	Gatesoupe (1994)
<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>Scophthalmus maximus</i>	Gatesoupe (1994)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Salmo salar</i>	Austin (1995)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Salmo salar</i>	Gildberg y col. (1995)
<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>Salmo salar</i>	Jöborn (1997)
<i>Carnobacterium divergens</i>	<i>Gadus morhua</i>	Gildberg y col. (1997)
<i>Carnobacterium divergens</i>	<i>Gadus morhua</i>	Gildberg y Mikkelsen (1998)
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	Queiroz y Boyd (1998)
<i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	Queiroz y Boyd (1998)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	Queiroz y Boyd (1998)
<i>Vibrio pelagius</i>	<i>Scophthalmus maximus</i>	Ringo y Vadstein (1998)
G-probiotic	<i>Oreochromis niloticus</i>	Naik y col. (1999)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Gram y col. (1999)
<i>Carnobacterium</i> spp.	<i>Salmo salar</i>	Robertson y col. (2000)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Nikoskelainen y col. (2001a)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Salmo salar</i>	Gram y col. (2001)
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Spanggaard y col. (2001)
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Anguilla anguilla</i>	Chang y Lui (2002)
<i>Bacillus toyoi</i>	<i>Anguilla anguilla</i>	Chang y Lui (2002)
<i>Carnobacterium</i> spp.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Irianto y Austin (2002)
<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Irianto y Austin (2002)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Irianto y Austin (2002)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pollachius pollachius</i>	Gatesoupe (2002)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Tovar y col. (2002)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Tovar y col. (2002)
<i>Streptococcus faecium</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Lara-Flores y col. (2003)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Lara-Flores y col. (2003)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Lara-Flores y col. (2003)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Nikoskelainen y col. (2003)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Raida y col. (2003)
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Raida y col. (2003)
<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Anguilla anguilla</i>	Lategan y Gibson (2003)
<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Bidyanus bidyanus</i>	Lategan y col. (2004)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Panigrahi y col. (2004,2005)
<i>Aeromonas media</i>	<i>Anguilla anguilla</i>	Lategan y col. (2004)

Tabla VI.- Probióticos utilizados en peces (continuación)

CEPAS PROBIÓTICAS	ESPECIE DE PEZ	REFERENCIA
<i>Roseobacter</i> sp.	<i>Scophthalmus maximus</i>	Hjelm y col. (2004)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Sparus aurata</i>	Carnevali y col. (2004)
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	<i>Sparus aurata</i>	Carnevali y col. (2004)
<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Brunt y Austin (2005)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Aubin y col. (2005)
<i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Aubin y col. (2005)
<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Aubin y col. (2005)
<i>Vibrio</i> sp.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Aubin y col. (2005)
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Solea senegalensis</i>	Chabrilón y col. (2005)
<i>Roseobacter</i> sp.	<i>Sparus aurata</i>	Makridis y col. (2005)
<i>Cytophaga</i> sp.	<i>Sparus aurata</i>	Makridis y col. (2005)
<i>Lactobacillus delbrüeckii</i>	<i>Sparus aurata</i>	Salinas y col. (2005)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Sparus aurata</i>	Salinas y col. (2005)
<i>Shewanella</i> sp.	<i>Sparus aurata</i>	Salinas y col. (2005)
<i>Paracoccus</i> sp.	<i>Sparus aurata</i>	Salinas y col. (2005)
<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Sparus aurata</i>	Salinas y col. (2005)
<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Sparus aurata</i>	Chabrilón y col. (2006)
<i>Vibrio</i> sp.	<i>Sparus aurata</i>	Chabrilón y col. (2006)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Carnevali y col. (2006)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Vendrell y col. (2007)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Vendrell y col. (2007)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Balcázar y col. (2007)
<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Balcázar y col. (2007)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Balcázar y col. (2007)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Sparus aurata</i>	Reyes-Becerra (2008)
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Capkin y Altinok (2008)
<i>Bacillus mojavenensis</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Capkin y Altinok (2008)
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Sparus aurata</i>	Suzer y col. (2008)
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Catla catla</i>	Bandyopadhyay y Mohapatra (2009)
<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Gadus morhua</i>	Lauzon y col. (2009)

Tabla VI.- Probióticos utilizados en peces (continuación)

CEPAS PROBIÓTICAS	ESPECIE DE PEZ	REFERENCIA
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Gadus morhua</i>	Lauzon y col. (2009)
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Perca fluviatilis</i>	Gobeli y col. (2009)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Epinephelus coioides</i>	Son y col. (2009)
<i>Kocuria</i> SM1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Sharifuzzaman y Austin (2010)
<i>Shewanella</i> spp.	<i>Solea senegalensis</i>	García de la Banda y col. (2010)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Ferguson y col. (2010)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Sparus aurata</i>	Avella y col. (2010)
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Sparus aurata</i>	Avella y col. (2010)
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Sparus aurata</i>	Avella y col. (2010)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Tovar y col. (2010)
<i>Alteromonas</i> sp.	<i>Sparus aurata</i>	Varela y col. (2010)
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Epinephelus coioides</i>	Sun y col. (2010)
<i>Leuconostoc</i>	<i>Acipenser persicus</i>	Askarian y col. (2011)
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Acipenser persicus</i>	Askarian y col. (2011)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Pérez y col. (2011)

Tabla VII.- Probióticos utilizados en moluscos y equinodermos

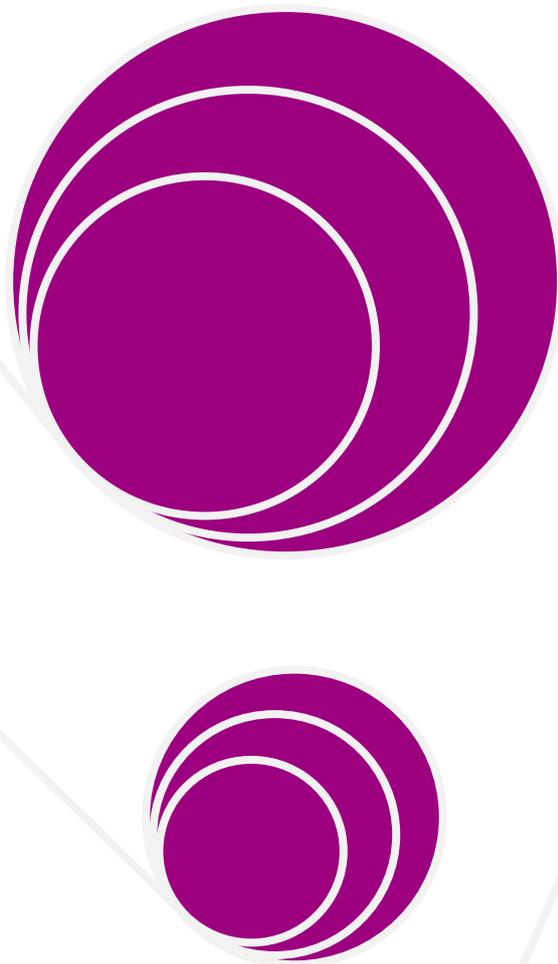
CEPAS PROBIOTICAS	ESPECIE	REFERENCIA
<i>Alteromonas</i> sp.	<i>Crassostrea gigas</i>	Douillet y Langdon (1993, 1994)
Levadura y bacteria	<i>Argopecten purpuratus</i>	Riquelme y col. (1997)
<i>Aeromonas media</i>	<i>Pecten maximus</i>	Gibson y col. (1998)
<i>Roseobacter</i> sp.	<i>Crassostrea gigas</i>	Ruiz-Ponte y col. (1999)
<i>Alteromonas haloplanktis</i>	<i>Argopecten purpuratus</i>	Riquelme y col. (2000)
<i>Vibrio</i> sp.	<i>Argopecten purpuratus</i>	Riquelme y col. (2001)
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Argopecten purpuratus</i>	Riquelme y col. (2001)
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Argopecten purpuratus</i>	Riquelme y col. (2001)
<i>Aeromonas media</i>	<i>Haliotis midae</i>	Alavandi y col. (2004)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	Macey y Coyne (2005)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	<i>Haliotis midae</i>	Doeschate y Coyne (2008)
<i>Vibrio</i> sp.	<i>Perna canaliculus</i>	Kesarcodi-Watson y col. (2009)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Apostichopus japonicus</i>	Zhang y col. (2010)

Tabla VIII.- Probióticos utilizados en crustáceos

CEPAS PROBIOTICAS	ESPECIE	REFERENCIA
<i>Thalassobacter utilis</i>	<i>Portunus trituberculatus</i>	Nogami y col. (1997)
<i>Bifidobacteria thermophilum</i>	<i>Penaeus japonicus</i>	Itami y col. (1998)
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Penaeus monodon</i>	Phianphak y col. (1999)
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Penaeus monodon</i>	Moriarty (1998)
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Penaeus monodon</i>	Rengpipat y col. (1998)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Scholz y col. (1999)
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Penaeus monodon</i>	Rengpipat y col. (2000)
Bacteria marina	<i>Penaeus monodon</i>	Chythanya y col. (2002)
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Penaeus vannamei</i>	Balcázar y col. (2006)
<i>Vibrio hepatarius</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Balcázar y col. (2006)
<i>Vibrio</i> sp.	<i>Penaeus vannamei</i>	Balcázar y col. (2006)
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Penaeus monodon</i>	Meunpol y col. (2003)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penaeus monodon</i>	Vaseeharan y col. (2004)
<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Penaeus monodon</i>	Alavandi y col. (2004)
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Penaeus stylirostris</i>	Castex y col. (2008)
<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Penaeus stylirostris</i>	Castex y col. (2008)
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Macrobranchium rosenbergii</i>	Venkat y col. (2004)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Penaeus chinensis</i>	Li y col. (2006)
<i>Arthrobacter</i> XE-7	<i>Penaeus monodon</i>	Gullian y col. (2004)
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Macrobranchium rosenbergii</i>	Venkat y col. (2004)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Penaeus chinensis</i>	Li y col. (2006)
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Penaeus stylirostris</i>	Castex y col. (2008)
<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Penaeus stylirostris</i>	Castex y col. (2008)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Penaeus stylirostris</i>	Castex y col. (2008)
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Zhou y col. (2009)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Tseng y col. (2009)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Liu y col. (2010)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Penaeus stylirostris</i>	Castex y col. (2010)
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Homarus gammarus</i>	Daniels y col. (2010)

Tabla IX.- Probióticos utilizados en alimento vivo

CEPAS PROBIOTICAS	ESPECIES	REFERENCIA
Bacteria ácido láctica	<i>Brachionus plicatilis</i>	Gatesoupe (1991)
Bacteria marina	<i>Chaetoceros ceratosporum</i>	Fukami y col. (1992)
<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Chaetoceros gracilis</i>	Suminto y Hirayama (1996, 1997)
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Brachionus plicatilis</i>	Shiri-Harzevili y col. (1998)
<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Brachionus plicatilis</i>	Hirata y col. (1998)
Mezcla bacterias	<i>Skeletonema costatum</i>	Rico-Mora y col. (1998)
Bacteria marina	<i>Isochrysis galbana</i>	Avendaño y Riquelme (1999)
Bacterias marinas	<i>Artemia</i> sp.	Verschuere y col. (1999)
<i>Alteromonas</i> sp.	<i>Artemia franciscana</i>	Douillet (2000 a,b)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Chaetoceros muelleri</i>	Gómez-Gil y col. (2002)
<i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>Artemia franciscana</i>	Orozco-Medina y col. (2002)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Artemia</i> sp.	Gatesoupe (2002)
Bacteria ácido láctica	<i>Artemia</i> sp.	Villamil y col. (2003)
Bacteria ácido láctica	<i>Brachionus plicatilis</i>	Planas y col. (2004)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Brachionus plicatilis</i>	Gunasekara y col. (2010)



III-MATERIAL Y MÉTODOS



III.- MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.- AISLAMIENTO DE CEPAS PROBIÓTICAS

Para el aislamiento de las posibles cepas probióticas hemos muestreado un total de 4 especies de peces con importancia actual en el desarrollo de la acuicultura marina canaria. Para ello hemos utilizado 60 lubinas (*Dicentrarchus labrax*), 80 doradas (*Sparus aurata*), 30 corvinas (*Argyrosomus regius*) y 25 lenguados (*Solea solea*).

Todos los peces utilizados, procedentes del Instituto Canario de Ciencias Marinas, perteneciente a la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI), estuvieron previamente alimentados con la dieta Comercial YM 558 de BioMar y mantenidos en circuito abierto bajo excelentes condiciones sanitarias. Los muestreos se realizaron en diferentes épocas del año, y los peces tenían diferentes pesos, ya que los ejemplares muestreados representaban diferentes etapas del ciclo productivo. Antes de la toma de muestras, los peces se mantuvieron en ayuno durante 48 horas y posteriormente fueron trasladados al laboratorio de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, donde fueron anestesiados (5 ml de aceite de clavo por cada 100 litros de agua de mar), y posteriormente sacrificados por inmersión en hielo para su procesado.

Cada ejemplar muestreado fue sometido a necropsia reglada para la extracción de su paquete intestinal. Posteriormente se procedió a la apertura del intestino anterior donde se recolectó 1 gramo de su contenido intestinal. A partir de esta muestra de contenido intestinal, se hicieron diluciones seriadas (1/10 a 1/1000), y con ayuda de un asa de Dygraski se sembraron 100 µl de cada una de ellas en diferentes medios de cultivo para tratar de conseguir la mayor diversidad de especies bacterianas posibles. Para ello empleamos los medios de cultivo Agar Marino (AM), Agar Infusión Cerebro Corazón (BHIA), Agar sangre (AS), Agar Triptona de Soja (TSA) y medio Man Rogosa y Sharpe (MRS), todos ellos de la casa comercial Pronadisa (Laboratorios Conda, Madrid, España) y preparados según instrucciones del fabricante (Anexo I), adicionando un 1% extra de cloruro sódico a los medios AS y BHIA para facilitar el crecimiento de bacterias marinas.

Una vez hecha la siembra, los medios de cultivo se mantuvieron en estufa entre 2-7 días a 25°C en aerobiosis, siendo observados diariamente para observar crecimiento. Cada colonia diferente, en base a sus características morfológicas, fue sembrada en cultivo puro en medio TSA y conservadas por liofilización y congelación a -80°C en Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHIB) (Pronadisa) con un 15% de glicerol para su posterior evaluación como posibles cepas probióticas.

III.2.- SELECCIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS

Del total de cepas aisladas a partir del intestino de las diferentes especies de peces se seleccionaron las bacterias Gram positivas, oxidasa y catalasa negativas, debido a que la mayoría de las cepas utilizadas como probióticos en acuicultura pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (Ringo y col., 2010). Posteriormente, la evaluación final como posibles cepas probióticas se realizó mediante el análisis de diferentes propiedades que debe cumplir una cepa para ser considerada como tal (Verschuere y col., 2000a). Estas propiedades se analizaron mediante la realización de una serie de pruebas *in vitro* y pruebas *in vivo*, y son las que se detallan a continuación. Todas las cepas que fueron preseleccionadas en esta fase se sometieron a su identificación microbiológica, según los procedimientos señalados en el punto III.2.2.

III.2.1.- Mecanismos de acción *in vitro*

III.2.1.1.- Inhibición del crecimiento de patógenos de interés en piscicultura

Determinar si la cepa aislada produce o no un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de diferentes patógenos de la acuicultura marina y continental fue el método que nos permitió realizar la preselección del total de las cepas aisladas para su posterior evaluación como cepas probióticas (Austin y col., 1992). En la Tabla X observamos en detalle las cepas patógenas en acuicultura usadas en esta experiencia para la determinación del efecto inhibitorio sobre su crecimiento por parte de las cepas probióticas seleccionadas. Los patógenos se cultivaron en BHIB durante 24 horas a 25°C para obtener un cultivo en fase exponencial. Posteriormente se centrifugó el medio a 5.000 rpm durante 5 minutos, retirando el sobrenadante y lavando el precipitado dos veces con PBS estéril, ajustándose por espectrofotometría (Biophotomer, Eppendorf, AG) a 1 de absorbancia a una longitud de onda de 600nm para obtener una concentración aproximada de 10^9 ufc/ml, previamente confirmada por recuento en placa mediante diluciones seriadas. A partir de esta

concentración se realizan diluciones seriadas 1/10 hasta la concentración de 10^7 ufc/ml, sembrando 100µl de esta dilución con ayuda de un asa de Dygraski en placas con medio TSA. Por otra parte, las cepas preseleccionadas como posibles cepas probióticas, se sembraron por agotamiento en medio TSA durante 24 horas a 25°C, y posteriormente tomamos una pequeña muestra con ayuda del asa de siembra y la depositamos sobre la placa con medio TSA donde se había colocado previamente cada cepa patógena.

Tabla X.- Patógenos para la acuicultura, utilizados en la experiencia de inhibición del crecimiento de las cepas probióticas preseleccionadas

Cepa patógena en acuicultura	Origen	Fuente	Especie
<i>Vibrio anguillarum</i> 4347	CECT	C.Esteve	Anguila (<i>Anguilla anguilla</i>)
<i>Vibrio anguillarum</i> 975-1	IA-USC	J.Barja	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> 94/99	IUSA	F.Real	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> C2	IUSA	F.Real	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> DI-21	ATCC	L.Toranzo	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> 17911	ATCC	B.Sniezko	Perca (<i>Perca fluviatilis</i>)
<i>Vibrio alginolyticus</i> 521	CECT	K.Nakamura	Jurel (<i>Trachurus trachurus</i>)
<i>Yersinia ruckeri</i> I	UL	J.Ramos	Trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
<i>Yersinia ruckeri</i> 250	UL	J. Ramos	Trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
<i>Yersinia ruckeri</i> ppi 661	UL	J. Ramos	Trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
<i>Yersinia ruckeri</i> 955	CECT	A.Toranzo	Trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
<i>Lactococcus garvieae</i> 102507	CIP	R.Kusuda	Trucha común (<i>Salmo trutta</i>)
<i>Streptococcus iniae</i> IUSA-1	IUSA	D.Padilla	Bocinegro (<i>Pagrus pagrus</i>)

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo. Universidad de Valencia

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

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

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

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

UL: Universidad de León. Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales

III.2.1.2.- Producción de sustancias antibacterianas

Una vez seleccionadas las cepas con demostrado efecto inhibitorio sobre el crecimiento de diferentes agentes patógenos en acuicultura, se realizó el análisis de la producción de sustancias antibacterianas que nos permite evaluar si el efecto inhibitorio observado es debido a sustancias extracelulares con efecto antibacteriano que produce la bacteria durante su crecimiento. La producción de sustancias antibacterianas se evaluó por tres metodologías diferentes y los patógenos utilizados fueron *V. anguillarum* y *P. damsela* subsp. *piscicida*, dos importantes patógenos de la acuicultura marina.

a) Método de la doble capa

Partimos de 10 µl de un cultivo de 24 horas en BHIB de las cepas seleccionadas como posibles cepas probióticas con demostrado efecto inhibitorio frente a uno o a varios de los agentes patógenos probados, depositándolos con micropipeta sobre placas de Petri con medio TSA. Tras 24 horas de incubación a 25°C, y con la finalidad de matar a las bacterias, las colonias fueron expuestas durante 45 minutos a vapores de cloroformo. Este ensayo se realizó bajo estrictas medidas de seguridad en una campana de extracción de gases. Una vez transcurrido esos 45 minutos, en dicha placa se depositaron 4 ml de medio TSB semisólido, que se preparó añadiendo al medio TSB un 0,8% de agar (Anexo I). A este medio le adicionamos 100 µl de una suspensión bacteriana con una concentración 10^9 ufc/ml de cada una de las cepas patógenas utilizadas. Posteriormente, las placas se incuban durante 24 horas a 25°C, considerando la existencia de inhibición del crecimiento del patógeno alrededor de la cepa probiótica inactivada con cloroformo, un resultado positivo a la existencia de sustancias antibacterianas (Dopazo y col., 1988).

b) Método de difusión en disco

Cultivos de 24 horas en medio BHIB de las posibles cepas probióticas a evaluar fueron centrifugados a 3.000 g durante 10 minutos. Los sobrenadantes se pasaron por filtros estériles de celulosa de 0,22 µm, y 250 µl de este filtrado fueron depositados sobre discos blancos estériles (Sigma) de 5 milímetros de diámetro, dejándolo secar toda la noche dentro de una estufa a 25°C. Una vez secos los discos, se colocaron sobre placas con medio TSA que previamente fueron sembrados con 100 µl de un cultivo de 24 horas a una concentración de 10^7 ufc/ml de cada uno de los patógenos a analizar. Tras 24 horas de incubación a 25°C, la presencia de inhibición del crecimiento alrededor del disco indica la producción de sustancias antibacterianas (Olsson y col., 1992).

c) Método de difusión en pocillo

En este ensayo seguimos la metodología descrita por Nikoskelainen y col. (2001b) con pequeñas modificaciones (Kim y Austin, 2008). Las cepas seleccionadas fueron cultivadas en 10 ml de medio BHIB a 25°C durante 48 horas, y tras este periodo fueron centrifugadas a 2.000 g durante 10 minutos y los sobrenadantes pasados por filtros de celulosa estériles de 0,45 µm. La mitad del sobrenadante se neutralizó con hidróxido de sodio (NaOH) 5N hasta alcanzar un pH de 6,8. La otra mitad del sobrenadante no fue neutralizada, y ambos sobrenadantes fueron liofilizados y concentrados 10 veces antes de

su utilización. Las cepas patógenas se cultivaron en medio BHIB (Anexo I), posteriormente se centrifuga a 2.000 g durante 10 minutos y se realizan dos lavados con PBS. 100 µl de la suspensión de cada una de las cepas patógenas (10^7 ufc/ml) fueron sembradas en placas con medio TSA por triplicado, donde previamente se hicieron 4 pocillos con puntas de pipeta estériles. En un pocillo se depositaron 10 µl del sobrenadante de cada una de las cepas con pH neutralizado (pH 6,8), mientras que en el siguiente se depositaron 10 µl de sobrenadante sin neutralizar (pH 5,2). En los pocillos restantes se depositó medio BHIB neutralizado y sin neutralizar para determinar la posible actividad inhibitoria del medio. Después de un periodo de incubación de 48 horas a 22°C se observan halos de inhibición alrededor del pocillo.

Interpretación:

La presencia de áreas de inhibición en los pocillos con el sobrenadante sin neutralizar significa que la producción de sustancias antibacterianas podría ser debido a la presencia de ácidos, mientras que si la inhibición se produce en pocillos neutralizados previamente, se debe a sustancias de otra naturaleza.

III.2.1.2.1.- Determinación de ácidos orgánicos

Una vez comprobada la producción de sustancias antibacterianas, y teniendo en cuenta que estos productos extracelulares pueden ser de diversa índole, como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno o ácidos orgánicos, hemos comprobado si en los productos extracelulares de nuestras cepas existen algunos de estos compuestos. Para ello, los sobrenadantes de los diferentes cultivos bacterianos se analizaron por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) pero solo para la determinación de ácidos orgánicos de cadena corta (ácido láctico y ácido acético).

Las bacterias preseleccionadas se cultivaron en 10 ml de medio BHIB durante 24 horas, y posteriormente centrifugadas a 6.000 g durante 10 minutos (Anderson y Hedlund, 1983). Los sobrenadantes se filtraron a través de una membrana estéril de 0,2 µm y se analizaron en el Departamento de Biocombustible y Bioproductos del Instituto Tecnológico Agrario de la Comunidad Autónoma de Castilla y León.

III.2.1.3.- Competición por nutrientes

Otro de los efectos que pueden presentar las cepas probióticas sobre los microorganismos patógenos es la competición por nutrientes, ya sea por la producción de sideróforos como por la competición activa de los nutrientes disponibles en el medio (Nikoskelainen y col., 2001b).

a) Producción de sideróforos

La producción de sideróforos por parte de las diferentes cepas seleccionadas como posibles cepas probióticas se analizó mediante la metodología descrita por Schwyn y Neilands (1987), que se basa en el cambio de color que experimenta el medio CAS agar (Chrome Azurol S) (Anexo II) al producirse una disminución en el contenido del hierro presente en el medio ya que está siendo utilizado por el metabolismo de la cepa bacteriana que está creciendo. Los sideróforos, que presentan una alta afinidad por el hierro, extraen hierro del medio produciendo un cambio en la coloración del mismo de azul hacia anaranjado.

El medio CAS-HDTMA (Anexo II) está compuesto por una solución A que se prepara mezclando 605 mg de Chrome Azurol S en 500 ml de agua destilada, para posteriormente añadirle 100 ml de una solución de 1mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Una vez hecha esta solución se añade lentamente la solución B, compuesta por 729 mg de HDTMA en 400 ml de agua destilada.

b) Inhibición del crecimiento en co-cultivo

En esta prueba cada una de las cepas analizadas como posibles cepas probióticas fueron cultivadas junto con cada una de las cepas patógenas seleccionadas en co-cultivo, siguiendo la metodología descrita por Nikoskelainen y col. (2001b). Brevemente, se cultivaron las cepas seleccionadas como posibles probióticos durante toda la noche en medio TSB, y posteriormente fueron centrifugadas a 2.000 g durante 10 minutos, realizándose dos lavados con PBS estéril con menor volumen que el inicial para facilitar la concentración de las bacterias. Las suspensiones bacterianas se ajustaron a 0,5 de absorbancia a 600 nm por espectrofotometría (Biophotomer). Con cada una de las cepas patógenas probadas hicimos el mismo procedimiento. Finalmente, 100 μl de cada suspensión bacteriana, probiótico y patógeno, fueron mezcladas en 1ml de medio TSB e incubadas durante 48 horas a 22°C, para posteriormente realizar diluciones seriadas (1/10 a

1/10.000) y proceder a su recuento en placa en medios de cultivo apropiados para cada una de las cepas. Como control positivo en cada caso utilizamos 100 μ l de PBS estéril junto a la cepa patógena en el mismo volumen de medio TSB.

III.2.1.4.- Resistencia a gradientes de pH y bilis

El objetivo de esta prueba es evaluar la capacidad de las cepas seleccionadas como posibles cepas probióticas a resistir pH ácidos y la acción de la bilis, simulando el tránsito gastrointestinal, como paso previo a la colonización bacteriana a nivel intestinal. En la experiencia de resistencia a pH ácidos, cada cepa seleccionada se cultivó en medio BHIB a 22°C durante 24 horas, y tras este periodo de incubación, fueron centrifugadas a 2.000 g durante 10 minutos y resuspendidas en PBS estéril hasta alcanzar una concentración final de 10^{10} ufc/ml (confirmado por recuento en placa y espectrofotometría). 10 μ l de cada una de las suspensiones obtenidas se depositaron por triplicado en 100 ml de PBS estéril a pH 3, 4, 5, 6 y 7, incubándolo durante 90 minutos a 22°C para su posterior recuento en placa. Para el ajuste del pH empleamos una solución de HCl 0,1M.

En la experiencia de resistencia a la acción de la bilis, las cepas seleccionadas se cultivaron en medio BHIB a 22°C durante 24 horas, para posteriormente centrifugarlas a 2.000 g durante 10 minutos, y realizar dos lavados con PBS estéril, ajustando hasta una concentración final de 10^7 ufc/ml. A esta concentración se le añade un 10% de bilis fresca de dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), corvina (*Argyrosomus regius*) y lenguado (*Solea solea*). Para ello, utilizamos peces de 400 gramos que fueron sometidos a un ayuno previo de 24 horas. Posteriormente fueron anestesiados (5 ml de aceite de clavo/100 litros de agua de mar) y sacrificados por inmersión en hielo. Una vez sacrificados, procedemos a la extracción de la secreción biliar por punción directa en condiciones de esterilidad con aguja fina. Las suspensiones bacterianas, adicionadas con un 10% de bilis se incubaron por triplicado durante 90 minutos a 22°C.

Transcurrido este tiempo, y tanto para la resistencia a pH ácido como a la acción de la bilis, se realizaron diluciones seriadas (1/10 a 1/1.000), y de cada dilución se depositaron 100 μ l sobre medio BHIA para proceder al recuento en placa del número de colonias (Nikoskelainen y col., 2001b). Como control de la experiencia utilizamos la posible cepa probiótica suspendida en PBS, siendo tratadas en las mismas condiciones que las suspensiones descritas anteriormente.

III.2.1.5.- Hidrofobicidad celular

Esta característica que pueden presentar algunas bacterias es utilizada como un indicador para una buena capacidad de adhesión a los tejidos. Este ensayo se realizó mediante el método de partición de dos fases en solventes orgánicos descrito por Ocaña y col. (1999), donde a 2,4 ml de una suspensión bacteriana de densidad óptica conocida (0,4 de absorbancia a una DO_{600}) se le añaden 600 μ l de xileno y se mezcla con vórtex durante 90 segundos. Posteriormente se deja reposar durante 30 minutos hasta la formación de las dos fases, la acuosa y la orgánica. Tras este periodo de tiempo, se remueve la parte inferior acuosa de la suspensión y se mide su absorbancia a 600 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, y el porcentaje de hidrofobicidad fue expresado como la reducción de la densidad óptica de la fase acuosa de la suspensión bacteriana tras ser mezclada con el xileno. Resultados positivos después de aplicar la fórmula indican que la pared celular de la bacteria es hidrofóbica, mientras que resultados negativos, indican que la cepa es hidrófila.

El porcentaje de hidrofobicidad (%H) fue calculado según la siguiente ecuación:

$$H = [DO_{(inicial)} - DO_{(después)} / DO_{(inicial)}] \times 100$$

Los valores obtenidos permiten clasificar a las cepas con una hidrofobicidad alta (71-100%), media (36-70%) y baja (0-35%).

III.2.1.6.- Adhesión de las bacterias al mucus intestinal

La adhesión al mucus intestinal de los peces es el primer paso para la colonización de las bacterias, siendo ésta otra de las propiedades que deben tener las bacterias para poder ser consideradas como probióticas. La capacidad de adhesión al mucus intestinal de los peces se evaluó mediante las técnicas de fluorescencia y radioactividad.

Para ambos métodos, se extrajo el mucus intestinal de doradas, corvinas, lubinas y lenguados con un peso medio de 400 gramos, que presentaron buenas condiciones sanitarias, y que fueron mantenidos previamente en ayuno durante 48 horas. Posteriormente, los peces, anestesiados con aceite de clavo y sacrificados por inmersión en hielo, fueron inmediatamente procesados siguiendo la metodología descrita por Chabrillón

y col. (2005). El mucus se obtiene raspando cuidadosamente la superficie del intestino con una espátula de plástico estéril, y una vez obtenida suficiente cantidad de mucus es homogenizado en PBS estéril a una dilución 1/3. La mezcla de PBS y mucus se centrifuga dos veces a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C para remover las partículas groseras y material celular, y el sobrenadante se pasa a través de un filtro de celulosa estéril de 0,45 µm. Posteriormente, las soluciones se homogenizan en PBS estéril hasta alcanzar una concentración proteica de 0,5 mg/ml, medida mediante el kit de análisis de proteína de Bradford (Sigma, Aldrich). Finalmente, la suspensión fue esterilizada por exposición a luz ultravioleta durante 30 minutos y conservada en alícuotas a -80°C hasta su uso, tanto con la técnica de determinación de la capacidad de adhesión al mucus por fluorescencia como por radioactividad.

Previamente, antes de realizar la prueba de adhesión al mucus de las cepas preseleccionadas, analizamos la capacidad de adhesión del mucus intestinal a las placas de 96 pocillos de polietileno (Nunc) mediante la técnica ELISA, usando lectina Dolichos Biflorus Aglutinina (DBA) de la casa comercial Sigma, con la finalidad de asegurarnos que el mucus se fijaría a la placa. Para realizar esta técnica seguimos la metodología descrita por Van der Marel y col. (2008). Brevemente, en una placa de 96 pocillos se depositan 75 µl de solución tapizado (Anexo II) y 25 µl del mucus de los peces diluido y se deja incubar durante toda la noche a 4°C para la fijación del mucus en la placa. Asimismo, se utilizó como control negativo 25 µl de la suspensión ASB (Anexo II) y como control positivo 25 µl de la suspensión de mucus de cerdo. Posteriormente, se realizan 3 lavados con una duración de 5 minutos con solución de lavado para eliminar restos del mucus, y se añaden 150 µl de solución bloqueadora (Anexo II), incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente, para posteriormente proceder a realizar 3 nuevos lavados. Transcurrida esta etapa, se añaden 100 µl de lectina DBA, incubando la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente, y realizando 3 nuevos lavados de 5 minutos con la solución de lavado. Tras los lavados, se añaden 100 µl de solución conjugado (Anexo II) y se incuba durante 30 minutos para, a continuación, realizar 3 lavados y añadir 100 µl de la solución sustrato, incubándola en total oscuridad durante 25 minutos. Transcurrida esta incubación, añadimos 100 µl de la solución *Stop* (Anexo II), y paramos la reacción. A continuación medimos la intensidad de la coloración en un espectrofotómetro (Thermo Scientific 357, Multiskan FC) a 600 nm de longitud de onda. La disposición de las muestras en la placa la podemos apreciar en el siguiente esquema.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M.P	M.P	M.P	M.P								
B	ASB	ASB	ASB	ASB								
C	MGC	MGC	MGC	MGC								
D												
E												
F												
G												
H	B	B	B	B								

M.P.- Mucus de peces

ASB.- Albúmina sérica bovina (control negativo de la técnica)

MGC.- Mucus gástrico de cerdo (control positivo de la técnica)

B.- Blanco (Agua destilada)

Una vez comprobada la fijación del mucus a la placa, continuamos con los ensayos para determinar la adhesión al mucus intestinal de las cepas, mediante las técnicas de fluorescencia y radioactividad.

a) Determinación de la adhesión mediante radioactividad

Para determinar las tasas de adhesión al mucus intestinal de las diferentes cepas probióticas mediante el uso del compuesto radioactivo timidina tritiada (methyl 1,2 ³H) (Amersham Biosciences) seguimos la metodología descrita por Nikoskelainen y col. (2001b). Esta experiencia se realizó en coordinación con el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Las diferentes cepas se cultivaron en 1ml de medio BHIB adicionado con 10 µl de timidina tritiada con una actividad específica de 117 Ci mmol/ml durante 18 horas a 22°C. Tras la incubación se centrifuga a 3.000 rpm durante 10 minutos, lavándose dos veces con PBS estéril, resuspendiendo el centrifugado en PBS hasta una concentración final de 10⁷ ufc/ml ajustado por espectrofotometría y posterior recuento en placa. Por otra parte, 100 µl del mucus se depositan en placas de 48 pocillos (Nunc) a 4°C durante toda la noche para su fijación. Tras la incubación, los pocillos se lavan dos veces con PBS estéril y se depositan 100 µl de la cepa probiótica a probar marcada metabólicamente con timidina tritiada,

incubando durante 1 hora a 22°C. Posteriormente, lavamos los pocillos con PBS estéril para retirar bacterias no fijadas, e incubamos con dodecilsulfato sódico (SDS) al 1% en NaOH (0,1N) durante 1 hora a 60°C para lisar las bacterias. El nivel de radioactividad de la suspensión lisada se midió mediante un contador de líquido de centelleo (Perkin Elmer, # A31001 200-260 Vac-1,8 amps), y el porcentaje de adhesión al mucus se expresa en DPM (degradaciones por minuto), siendo la relación existente entre el nivel de radioactividad recuperada tras la adhesión y el nivel de radiactividad presente en la suspensión inicial añadida al mucus inmovilizado. El análisis para cada cepa probada se realizó por cuadruplicado, expresando en los resultados el valor medio de esta lectura.

b) Determinación de la adhesión mediante fluorescencia

Este ensayo se realizó siguiendo la metodología descrita por Van der Marel y col. (2008). El mucus fue obtenido y preparado siguiendo la misma metodología anteriormente descrita. En esta experiencia, las cepas fueron marcadas con Syto 9 (Invitrogen), producto que tiñe selectivamente los ácidos nucleicos de la bacteria con una coloración verdosa. Las cepas seleccionadas se cultivan en medio BHIB durante 24 horas a 25°C y posteriormente se centrifuga el medio, ajustando de nuevo la suspensión hasta una concentración de 10^9 ufc/ml en PBS estéril por espectrofotometría y recuento en placa. Brevemente, 100 µl de Syto 9 (dilución 1/100) se adicionan a 900 µl de la suspensión bacteriana (10^9 ufc/ml), para posteriormente realizar un lavado con PBS, resuspendiéndolo en 900 µl de solución salina fisiológica. Por otra parte, en una placa de polietileno de color negro de 96 pocillos (Nunc) se depositan 25 µl de mucus con 75 µl de solución de tapizado (Anexo II) y se deja incubar durante 12 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo se realizan 3 lavados con PBS estéril para eliminar restos del mucus, y a continuación depositamos 25 µl de la bacteria teñida, dejando incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se hace un lavado con PBS estéril y se depositan 50 µl de solución salina para proceder a la lectura por espectrofotometría (Victor 1420 Multilabelcounter, Wallac) a 535 nm de emisión y excitación a 485 nm. El porcentaje de adhesión al mucus fue expresado como el porcentaje de fluorescencia de la bacteria fijada a las distintas superficies, en relación a la fluorescencia mostrada por la suspensión bacteriana sin fijar.

En ambos ensayos, para determinar si la adhesión al mucus de las cepas es debido a factores no específicos, utilizamos ASB (Anexo II) y el polietileno de la propia superficie de la placa, aplicando las mismas metodologías que las descritas anteriormente.

III.2.1.7.- Ensayo de exclusión competitiva

Esta prueba consiste en determinar si las cepas seleccionadas como cepas probióticas son capaces de competir con algún patógeno por sitios de fijación a nivel intestinal. Los patógenos utilizados fueron *V. anguillarum* y *P. damsela* subsp. *piscicida* y la determinación de esta prueba se hizo solo en mucus de lubina. En ambos métodos seguimos la metodología descrita anteriormente en el punto III.2.1.6 bajo las mismas condiciones y con pequeñas modificaciones como lo detallamos a continuación: en el ensayo con timidina, después de tener el mucus fijado a la placa durante 12 horas, depositamos 100 μ l de la suspensión de la cepa probiótica sin marcar (10^7 ufc/ml), incubamos durante 1 hora a 22°C y hacemos dos lavados con PBS estéril. A continuación colocamos 100 μ l de una suspensión del patógeno (10^7 ufc/ml) marcado con timidina, incubamos, lavamos y finalmente lisamos la bacteria con SDS (Anexo II), procediendo a la lectura en el contador de centelleo para la determinación de la exclusión mediante radioactividad. El porcentaje de exclusión es la relación entre el porcentaje de adhesión del patógeno en presencia de la cepa probiótica y el porcentaje de adhesión del patógeno en ausencia de la cepa probiótica.

En el ensayo para la determinación del porcentaje de exclusión mediante fluorescencia, tras la fijación del mucus se depositan 25 μ l de la suspensión bacteriana probiótica sin teñir (10^9 ufc/ml), dejamos incubar 30 minutos, lavamos y depositamos 25 μ l de la suspensión del patógeno (10^9 ufc/ml) teñido con Syto 9. Finalmente incubamos 30 minutos, lavamos y leemos en el espectrofotómetro (535 nm emisión y 485 nm excitación). El porcentaje de exclusión se expresa como la relación entre el porcentaje de adhesión del patógeno en presencia de la cepa probiótica y la adhesión del patógeno en ausencia de la cepa probiótica.

III.2.1.8.- Crecimiento de las cepas en el mucus intestinal

El mucus intestinal de las 4 especies de peces estudiadas (véase punto III.1.1) fue diluido en PBS estéril hasta una concentración proteica final de 0,5 mg/ml mediante el kit de análisis de proteína de Bradford (Sigma). Las cepas probióticas seleccionadas se cultivan en medio TSB durante 24 horas a 22°C. A continuación se hicieron dos lavados con PBS, y posteriormente, 10 μ l de cada suspensión bacteriana se adicionan a 3 ml de mucus diluido, medio TSB (como control positivo) o PBS (como control negativo), ajustando así su concentración inicial a 10^5 - 10^6 ufc/ml. Posteriormente se incuban en

agitación durante 24 horas a 22°C. Tras el periodo de incubación se realizó recuento en placa tras diluciones seriadas (1/10 a 1/10.000) en PBS estéril para conocer el crecimiento de las cepas en el mucus comparadas con los controles (Olsson y col., 1992).

III.2.2.- Identificación de las cepas probióticas

Las cepas que cumplieron los requisitos *in vitro* como potenciales cepas probióticas fueron sometidas a identificación mediante pruebas bioquímicas convencionales en placa y tubo siguiendo la metodología descrita por Smibert y Krieg (1981), a sistemas miniaturizados API 20E, API 20Step, API 32Strep y API 50CH (BioMérieux, Madrid, España), y secuenciación parcial del gen 16S rRNA.

En la secuenciación parcial del gen 16S rRNA, la extracción del ADN se realizó mediante kit comercial de extracción de ADN (Invitrogen). La técnica de la PCR para la amplificación de un segmento de 1200 pares de bases del gen 16S rRNA se realizó con una serie de cebadores universales basados en su región variable recN-F (5'GCAGGAAARTCTATTATYATTGATGC-3') y recN-R (5'-CWCCTGTATCAACTT CATCAA-3') mediante termociclador C1000 thermal cycler, (Biorad) siguiendo la metodología descrita por Arahall y col. (2008). Tras una desnaturalización inicial de 10 minutos a 94°C, se repiten 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C, finalizando con una fase de extensión de 10 minutos a 72°C. Para corroborar la amplificación del segmento del gen, la muestra fue sometida a electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 1 hora a 100 voltios. Transcurrido este tiempo, el gel de agarosa fue teñido con bromuro de etidio en buffer TAE 1X (Anexo II). Los productos de PCR fueron purificados con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante, y los fragmentos purificados fueron resuspendidos en 20 µl de buffer TE (Anexo II). El producto amplificado en cada cepa probiótica a identificar fue secuenciado por los servicios de identificación bacteriana de la Colección Española de Cultivos Tipo (Burjasot, Valencia, España) mediante secuenciador automático Abi Prism 3730 usando Big Dye Terminator v.3.1 cycle.

Una vez obtenida la secuencia parcial del gen 16S rRNA de cada cepa seleccionada, el análisis de la homología de la secuencia del ADN fue llevada a cabo con el programa BLAST. La búsqueda de secuencias homólogas se realizó con la base de datos depositados en GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information)

recogiendo la extensión del fragmento solapado, el porcentaje de semejanza y el nombre del microorganismo con un mayor grado de semejanza u homología.

III.2.3.- Otras características de las cepas probióticas seleccionadas

Con la finalidad de obtener más información sobre las características de las cepas seleccionadas que *in vitro* demostraron las mejores cualidades como potenciales cepas probióticas, hemos realizado una serie de pruebas adicionales como el estudio de los patrones de sensibilidad antibiótica, perfil de ácidos grasos, producción de biofilm, producción de enzimas hidrolíticas y actividad hemolítica.

a) Patrón de sensibilidad antibiótica

La sensibilidad antibiótica de las cepas se realizó por el método estándar de difusión de discos en agar Mueller-Hinton (Pronadisa), según metodología previamente descrita (Bauer y col., 1966). Los antibióticos probados fueron: eritromicina (15µg), penicilina (10U), estreptomycin (10µg), kanamicina (30µg), flumequine (30µg), vancomicina (5µg), bacitracina (10U), trimetoprim (5µg), gentamicina (30µg), cefalexina (30µg), cefoxitina (30µg), amoxicilina (30µg), cefalotina (30µg), y novobiocina (30µg), todos de la casa comercial Oxoid.

b) Perfil de ácidos grasos

Para analizar el perfil de ácidos grasos, las cepas seleccionadas fueron cultivadas en 20 ml de medio BHIB durante 24 horas. Tras una centrifugación a 5.000 g durante 10 minutos, el *pellet* es recogido y lavado dos veces con PBS estéril. A partir de este concentrado de células se realiza la extracción de lípidos totales mediante el método de Folch, seguido de una metilación. En el método descrito por Folch y col. (1957) se realiza una mezcla de cloroformo-metanol (C:M) a una concentración 2:1 v/v con un 0,01% de Butil hidroxitolueno (BHT). Una vez evaporado el solvente con una corriente de nitrógeno, los lípidos se pesan y se almacenan en atmósfera de nitrógeno y se disuelven en cloroformo para evitar su oxidación. A una muestra de entre 50-200 mg de lípidos se le añaden 5 ml de C:M (2:1) con 0,01 BHT. Homogenizamos en una centrífuga en frío (5 minutos a 2.000 rpm), se elimina el sobrenadante y volvemos a centrifugar con 5 ml de C:M. Posteriormente se añaden 2 ml de una solución de cloruro potásico al 0,88%, se centrifuga durante 5 minutos a 2.000 rpm para separar las dos fases, retirando la fase superior que es donde quedan retenidas las sales y el metanol. La fase inferior, que

contiene los lípidos y el cloroformo, se pasa a otro tubo por medio de un embudo con papel filtro, se evapora la muestra con una corriente de nitrógeno líquido y se pesan los lípidos, determinando su porcentaje mediante la relación existente entre los gramos de lípidos y los gramos de la muestra.

Para la metilación de los ácidos grasos, los lípidos totales se transesterifican con ácido sulfúrico al 1% en metanol según la metodología de Christie (1982). Los ácidos grasos metilados se diluyen en hexano y su separación, identificación y cuantificación se realiza mediante cromatografía de gases (Thermo; Finnigan Focus GC) en columna de sílice (30 mm x 0,32 mm x 0,25 µm), bajo las condiciones descritas por Izquierdo y col. (1990). La metodología para la metilación de los ácidos grasos incluye los siguientes pasos:

- Añadir 1 ml de Tolueno con BHT (50 mg/l) a un máximo de 80 mg de lípidos.
- Añadir 2 ml de Metanol:Sulfúrico al 1% en volumen. Agitar con intensidad.
- Llenar el tubo con N₂ y sellarlo.
- Incubar durante 16 horas a 50°C en manta calefactora, si es posible, en agitación y oscuridad.
- Dejar enfriar y añadir 3,5 ml de agua ultrapura.
- Añadir 4 ml de Hexano:Dietil éter 1:1 con BHT al 0,01%. Agitar.
- Centrifugar 5 minutos a 2.000 rpm.
- Transferir la fase superior a un segundo tubo.
- Volver a añadir al tubo original 4 ml de Hexano:Dietil éter 1:1 sin BHT. Agitar y centrifugar. Repetir el punto anterior.
- Añadir 3 ml de KHCO₃ al 2% al tubo que contiene las dos fases superiores extraídas. Agitar y centrifugar.
- Transferir la fase superior a un tercer tubo previamente pesado.
- Evaporar con N₂.
- Empapar un cartucho Sep-pack de NH₂ con 1-2 ml de Hexano HPLC.
- Disolver los FAMES con 1-2 ml de Hexano HPLC.
- Pasar la muestra al cartucho y colocar el tubo debajo.
- Dejar caer la muestra gota a gota, fluyendo posteriormente con 4 ml de Hexano HPLC.

- Evaporar completamente, pesar y diluir a concentración de 40 mg de FAMES por ml de hexano.
- Pasar a un vial y tapar. Usar microvial si es necesario.

c) Producción de biofilm

La cuantificación de biofilm de las cepas probióticas seleccionadas se realizó mediante la técnica descrita por Wen y Burne (2002). El ensayo se realizó por triplicado en placas de 96 pocillos estériles (Nunc) y con 4 réplicas para cada cepa estudiada. Brevemente, a partir de cultivos en placas de medio TSA se inocularon las cepas en matraces con 50 ml de medio líquido (BHIB y TSB), y tras un periodo de 24 horas de incubación a 25°C, centrifugamos y hacemos 3 lavados con PBS estéril, ajustándose la suspensión bacteriana con una absorbancia de 0,05 a 600 nm. 25 µl de esta suspensión bacteriana fueron depositados en cada pocillo de la placa que contiene 100 µl de medio BHIB y TSB, incubándose las placas a 25°C por diferentes tiempos (24, 48 y 72h), midiéndose la absorbancia a 600 nm para obtener la densidad celular. Las placas se cubrieron con papel de film para evitar el exceso de evaporación.

Al terminar el periodo de incubación se extrae la suspensión bacteriana (células no adheridas) y se coloca en otra placa para finalmente medir en el espectrofotómetro a 600 nm (Multiskan FC, Thermo Scientific 2.5). Por otra parte, las placas iniciales que contienen las células adheridas fueron lavadas dos veces con agua destilada estéril. Se deja secar al aire a temperatura ambiente y se añadieron 50 µl de cristal violeta (0,7% peso/volumen) para teñir la bacteria fijada. Dejamos incubar 12 minutos a temperatura ambiente y el exceso de colorante fue eliminado mediante varios lavados con agua destilada estéril. Tras los lavados, el cristal violeta fue eliminado con 125 µl de una solución de etanol absoluto y acetona (80:20 v/v), dejando la placa en un agitador orbital (Unimax 1010DT, Heidolph) durante 1 minuto a 400 rpm. Finalmente, 100 µl de la muestra fue transferida a otra placa y medimos la absorbancia a 630 nm por espectrofotometría.

d) Producción de enzimas hidrolíticas y actividad proteasa

La determinación de la producción de enzimas hidrolíticas se realizó mediante el sistema API ZYM (BioMérieux) siguiendo la metodología descrita por el fabricante. La

actividad proteasa fue observada en placa de BHIA suplementado con leche descremada al 4% mediante la siembra en estría de las cepas siguiendo la metodología de Leung (1987).

e) Actividad hemolítica

La actividad hemolítica de las cepas fue demostrada mediante siembras en estría sobre medio de agar sangre estéril, que contenía aproximadamente un 5% de sangre de oveja desfibrinada (Oxoid) según la metodología descrita por Janda (1985).

III.2.4.- Ensayo *in vivo*

Las cepas que mostraron *in vitro* unas excelentes propiedades como posibles cepas probióticas fueron sometidas a una serie de ensayos *in vivo* para determinar si las buenas cualidades *in vitro* se correlacionan *in vivo* ejerciendo efecto protector sobre peces enfrentados a patógenos marinos. Los ensayos *in vivo* se realizaron en la sala de ictiopatología ubicada en las instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas del Gobierno de Canarias (Telde), que controla y mantiene nuestro grupo de investigación. Las instalaciones constan de 18 tanques de 500 litros en circuito cerrado con aireación constante mediante difusores realizando dos renovaciones diarias de agua para mantener un agua de buena calidad. El agua eliminada en las renovaciones se desinfectó con hipoclorito de sodio y se neutralizó con sosa antes de ser eliminada de la instalación.

Los peces sometidos a ensayos *in vivo* fueron alimentados diariamente con el 2% de su biomasa, y antes del inicio de cada experiencia los peces se mantuvieron durante 15 días en periodo de aclimatación con fotoperiodo controlado de 12 horas, realizándose muestreos al azar mediante la siembra y cultivo de diferentes órganos internos para garantizar que se encontraban libres de patógenos específicos.

III.2.4.1.- Determinación de la inocuidad de las cepas

Este ensayo se realizó con la finalidad de comprobar que las cepas seleccionadas como posibles cepas probióticas son inocuas, entendiéndose por este término la capacidad de no producir daño alguno al hospedador tras su administración. Para la realización de esta experiencia se utilizaron tanques de 500 litros con 10 lubinas por tanque y con un peso aproximado de 10 gramos. Las cepas candidatas a cepas probióticas fueron cultivadas en medio BHIB a 22°C durante 24 horas. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado a 2.000 g durante 5 minutos, realizándose dos lavados con PBS estéril, ajustando la suspensión

bacteriana por espectrofotometría a una absorbancia de 1, medida a una longitud de onda de 600 nm y posterior recuento en placa.

El ensayo se realizó por inoculación de la cepa vía intraperitoneal, donde utilizamos 100 µl de una suspensión bacteriana con una concentración final de 10^8 ufc/ml, de cada una de las cepas seleccionadas como posibles cepas probióticas. Todos los ensayos para cada una de las cepas fueron realizados por triplicado. Asimismo, como control negativo se utilizaron 10 lubinas (*Dicentrarchus labrax*) por tanque, inoculadas al mismo tiempo con 100 µl de PBS estéril.

Tras la inoculación de cada una de las cepas seleccionadas, los peces se mantuvieron en observación diaria durante un mes para determinar posibles bajas, lesiones y/o cualquier signo de enfermedad. Pasado el periodo de evaluación los peces fueron anestesiados con aceite de clavo y sacrificados por inmersión en hielo, siendo transportados en bolsas estériles con refrigeración hasta el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA) de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Tras necropsia reglada se anotaron datos de posibles lesiones internas y externas, y se tomaron muestras de hígado, bazo, riñón y cerebro para su estudio microbiológico e histopatológico. Este último estudio se hizo en colaboración con el grupo de Anatomía Patológica del IUSA.

III.2.4.2.- Incorporación del probiótico en la dieta experimental

La dieta experimental se preparó siguiendo la metodología descrita por Irianto y Austin (2002). Las cepas seleccionadas como potenciales cepas probióticas se cultivaron en medio BHIB durante 24 horas a 22°C. Posteriormente, se centrifugaron a 2.000 g durante 5 minutos, realizándose dos lavados con PBS estéril, ajustando la suspensión bacteriana una concentración de 10^{10} ufc/ml en PBS por espectrofotometría y posterior recuento en placa. Finalmente, 20 ml de dicha suspensión fue adicionada a 120 gramos de pienso comercial YM 558 de BioMar por pulverización directa y secado en estufa a 25°C durante 24 horas, obteniendo una concentración final de 10^9 ufc/gramo de alimento. Para determinar la viabilidad de las cepas seleccionadas adicionadas al pienso por pulverización con el paso del tiempo, el pienso fue mantenido en refrigeración, analizándose 1 gramo de pienso mediante el método de recuento en placa en medio TSA y BHIA tras ser

homogenizado en 9 ml de PBS estéril. Estos análisis se realizaron, diariamente, durante un periodo de 20 días.

III.2.4.3.- Colonización

Para valorar la capacidad de colonización de las cepas seleccionadas como probióticas en la mucosa intestinal de las lubinas, las cepas fueron administradas vía oral adicionadas al pienso durante 20 días. Pasado este tiempo, se realizó un análisis microbiológico a partir de 1 gramo de intestino extraído asépticamente para el aislamiento, identificación y cuantificación de las cepas administradas en la dieta experimental.

Los muestreos fueron realizados diariamente y hasta los 10 días después de haber dejado de alimentar a las lubinas con la dieta experimental, realizándose todos estos análisis por triplicado. El recuento en placa de la cepa probiótica suministrada se realizó en medio base de salinidad (Anexo I) al 0% de cloruro sódico con el objetivo de eliminar gran parte de la microbiota intestinal autóctona que nos dificultaría y enmascararía el aislamiento de las cepas probióticas adicionadas al pienso.

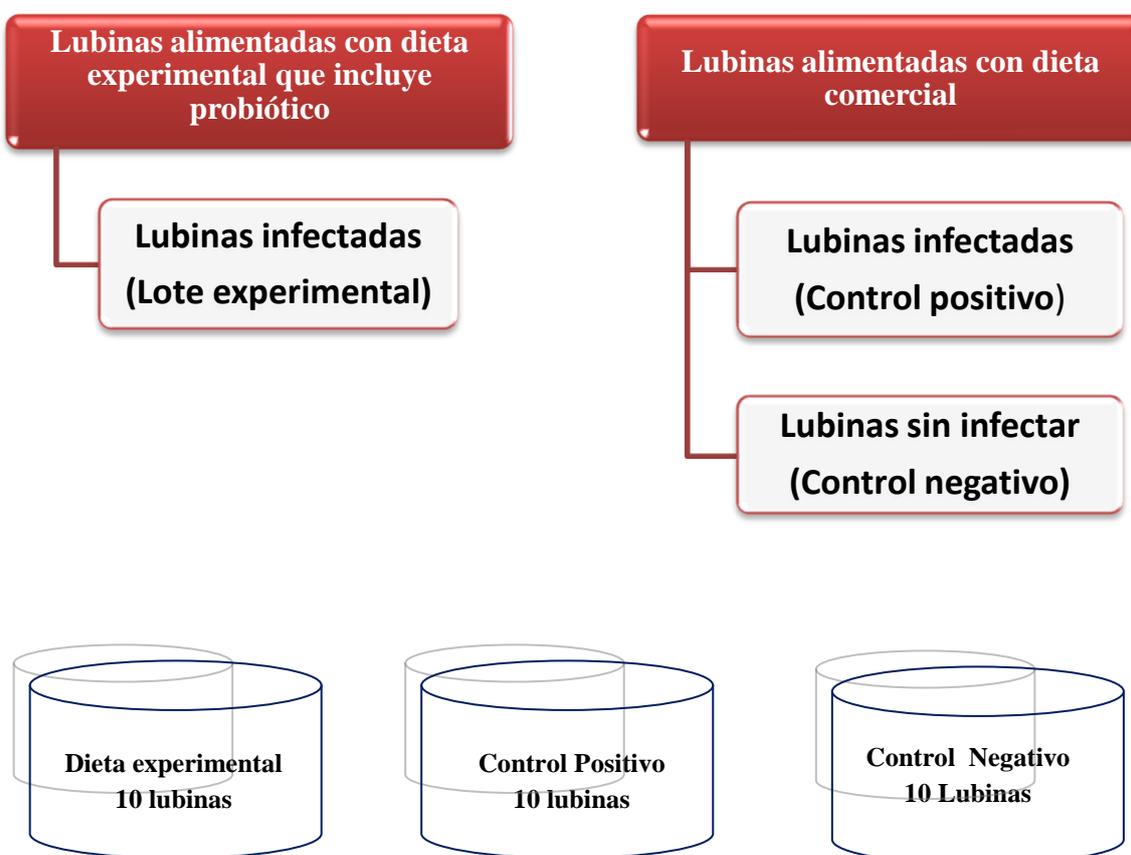
III.2.4.4.- Efecto protector frente a una infección experimental con *Vibrio anguillarum*

El objetivo de esta experiencia fue determinar el posible efecto protector de las cepas seleccionadas *in vitro* como candidatas a cepas probióticas frente a una infección experimental con *V. anguillarum*. Este patógeno fue elegido por la gran importancia que presenta en la acuicultura marina española y mundial. Previa a la inoculación experimental se llevó a cabo la activación del patógeno. Para ello se realizaron dos pases consecutivos del patógeno en lubinas por vía intraperitoneal, recuperando la cepa inoculada a partir de órganos internos de los animales muertos. Una vez activado el patógeno, se cultivó en medio BHIB suplementado con un 1,5% de cloruro sódico en agitación durante 24 horas. Posteriormente se realizaron tres lavados en PBS estéril, y finalmente el patógeno se resuspendió en agua de mar estéril para la infección. Antes del experimento final de protección, se hizo un ensayo previo a pequeña escala con las 4 cepas preseleccionadas. Para ello, se utilizaron lubinas (*Dicentrarchus labrax*) con un peso medio de 18 gramos, distribuidas en tanques de 500 litros con un total de 10 lubinas por tanque.

La experiencia se realizó por triplicado y la distribución de los peces se hizo al azar tras un periodo de aclimatación de 15 días, separando al grupo de peces alimentados con

las cepas probióticas preseleccionadas y los grupos control positivo y negativo. Todos los grupos fueron alimentados durante 30 días, unos con la dieta experimental (III.2.4.2) y los controles se alimentaron con la dieta comercial YM 558 de BioMar que no incluye el probiótico. Posteriormente, todos los grupos menos el control negativo con sus réplicas fueron infectados con el patógeno. La inoculación experimental con la cepa *V. anguillarum* 975-1 se realizó por baño durante 8 horas a una concentración de 10^8 ufc/ml, aumentándose la temperatura del agua de 21°C a 24°C al inicio de la infección para incrementar el efecto final de la infección. Pasado el tiempo de exposición con el patógeno, los peces se mantuvieron en observación durante 20 días, contabilizando las posibles bajas. Tras el ensayo previo, utilizamos en el experimento definitivo solo aquellas cepas que habían mostrado alguna protección frente a la infección con *V. anguillarum*. El control negativo sin infectar fue tratado de la misma forma que el resto de los grupos. Un resumen del diseño de esta experiencia se representa en el Esquema I.

Esquema I.- Diseño de evaluación a escala del efecto protector de los probióticos seleccionados en la lubina, tras la infección con *V. anguillarum* 975-1. Todos los experimentos se realizan por triplicado.



Finalmente, después de este ensayo a escala previo, seleccionamos las mejores cepas probióticas candidatas y repetimos con éstas el ensayo de la infección experimental con *V. anguillarum*, utilizando el mismo diseño experimental, pero aumentando a 50 el número de peces por tanque.

Las condiciones de cultivo fueron las mismas y, tanto en el ensayo previo como el final, se evaluó el efecto protector del probiótico, mediante la determinación del porcentaje relativo de supervivencia (PRS) como se describe a continuación:

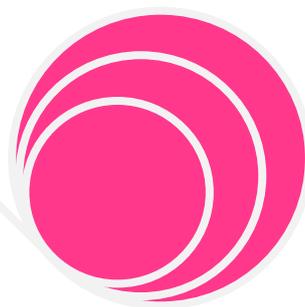
$$PRS = 1 - \frac{\text{Mortalidad de los peces infectados que recibieron la dieta experimental}}{\text{Porcentaje de mortalidad de los peces que recibieron la dieta comercial}} \times 100$$

De igual modo se contabilizaron diariamente los peces muertos y/o moribundos que empezaron a manifestar los signos típicos de la enfermedad. Además, se tomaron muestras de todos estos peces para su posterior estudio microbiológico e histopatológico. A partir de los órganos internos (hígado, bazo, riñón y cerebro) de los peces se sembraron en los medios de cultivo TCBS y BHIA con la finalidad de recuperar la cepa patógena inoculada, para posteriormente ser sometida a pruebas bioquímicas y/o moleculares para confirmar su identificación. La identificación del patógeno y aislado en los medios de cultivo se realizó por métodos clásicos de identificación microbiología (Smibert y Krieg, 1973), API 20E, y finalmente confirmada mediante la técnica de la PCR siguiendo la metodología descrita por González y col. (2003) con los cebadores 5'-GTTCATAGCATCAATGAGGAG-3' y 5'-GAGCAGACAATATGTTGGATG-3' con una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 40 segundos a 72°C, finalizando con una extensión de 5 minutos a 72°C. La amplificación se realizó con un termociclador C1000 thermal cycler (Biorad). Para el análisis del producto de PCR se utilizó un gel de agarosa al 1% (100 voltios durante 1 hora) que fue teñido con bromuro de etidio en buffer TAE 1X, visualizando dicho producto en un transiluminador de UV (Universal Hood II, Biorad).

II.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se hicieron por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante el modelo general univariante. La validación de método se hizo comprobando la normalidad de los datos mediante la homogenización de la varianza ($P < 0,05$). Todos estos parámetros fueron examinados mediante el paquete estadístico SPSS para Windows, version 18.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

IV-RESULTADOS



IV.- RESULTADOS

IV.1.- CEPAS PROBIÓTICAS OBTENIDAS

Tras el procesado del contenido intestinal de todos los peces de las 4 especies de peces analizadas, dorada, lubina, corvina y lenguado, obtuvimos un total de 523 cepas diferentes, de las cuales, se preseleccionaron un total de 120 cepas que se correspondían con cocos y cocobacilos Gram positivos, catalasa y oxidasa negativos. De estas 120 cepas preseleccionadas, 32 cepas fueron aisladas de dorada, 38 de lubina, 26 de corvina y 24 de lenguado.

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

IV.2.1.- Producción de efecto inhibitorio del crecimiento frente a patógenos

Tras la evaluación de las cepas preseleccionadas, solo 15 cepas mostraron efecto inhibitorio frente a uno o varios de los patógenos de la acuicultura marina y/o continental analizados (Tabla X), pero 3 de estas cepas perdieron dicho efecto después de la conservación y tras manipulaciones repetidas en el laboratorio.

En la Tabla XI observamos el efecto inhibitorio del crecimiento de las 12 cepas preseleccionadas frente a los patógenos seleccionados. De estas 12 cepas, fueron aisladas del intestino de dorada las cepas D3S1, D1, DG, DP, L1, L2 y L3, de intestino de lenguado las cepas L6, L12 y L21, de intestino de corvina la cepa LC, y de intestino de lubina la cepa LL. Como observamos en dicha tabla, todas estas cepas mostraron efecto inhibitorio frente a los patógeno *Vibrio anguillarum* CECT 4347 y *V. anguillarum* 975-1, así como frente a las cuatro cepas de *Yersinia ruckeri* analizadas (*Y. ruckeri* I, *Y. ruckeri* 250, *Y. ruckeri* ppi 661 y *Y. ruckeri* 955). Todas las cepas analizadas mostraron efecto inhibitorio frente a las cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 94/99, C2, ATCC DI-21 y ATCC 17911, a excepción de las cepas D3S1, DG y DP aisladas de dorada. Ninguna de las 12 cepas preseleccionadas presentó efecto inhibitorio frente a las cepas analizadas de las especies *Lactococcus garvieae*, *Vibrio alginolyticus* y *Streptococcus iniae*. En las Figuras 1, 2 y 3 observamos los halos de inhibición producidos por las diferentes cepas probióticas seleccionadas frente a *V. anguillarum*, *P. damsela* subsp. *piscicida* y *Y. ruckeri*.

Tabla XI.- Inhibición del crecimiento frente a diferentes patógenos para la acuicultura realizada con las 12 cepas preseleccionadas como posibles probióticas

PATÓGENOS UTILIZADOS	CEPAS PROBIÓTICAS											
	D3S1	D1	L1	L21	DG	DP	LC	L2	L3	L6	L12	LL
<i>V. anguillarum</i> CECT 4347	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>V. anguillarum</i> 975-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> 94/99	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> C2	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> ATCC DI-21	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> ATCC 17911	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>V. alginolyticus</i> 521	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia ruckeri</i> I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Yersinia ruckeri</i> 250	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Yersinia ruckeri</i> ppi 661	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Yersinia ruckeri</i> 955	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactococcus garvieae</i> 102507	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus iniae</i> IUSA-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 1.- Inhibición del crecimiento de las cepas D3S1, L1 y L21 frente al patógeno *Vibrio anguillarum* 975-1

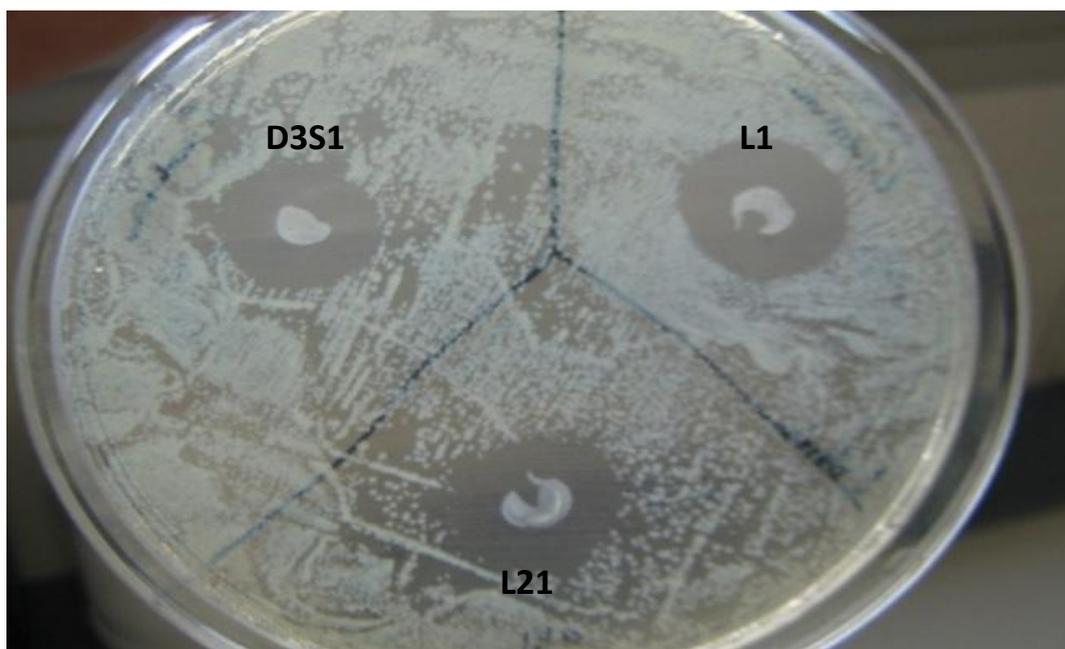


Figura 2.- Inhibición del crecimiento de las cepas D1, L1 y L21 frente al patógeno *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 94/99

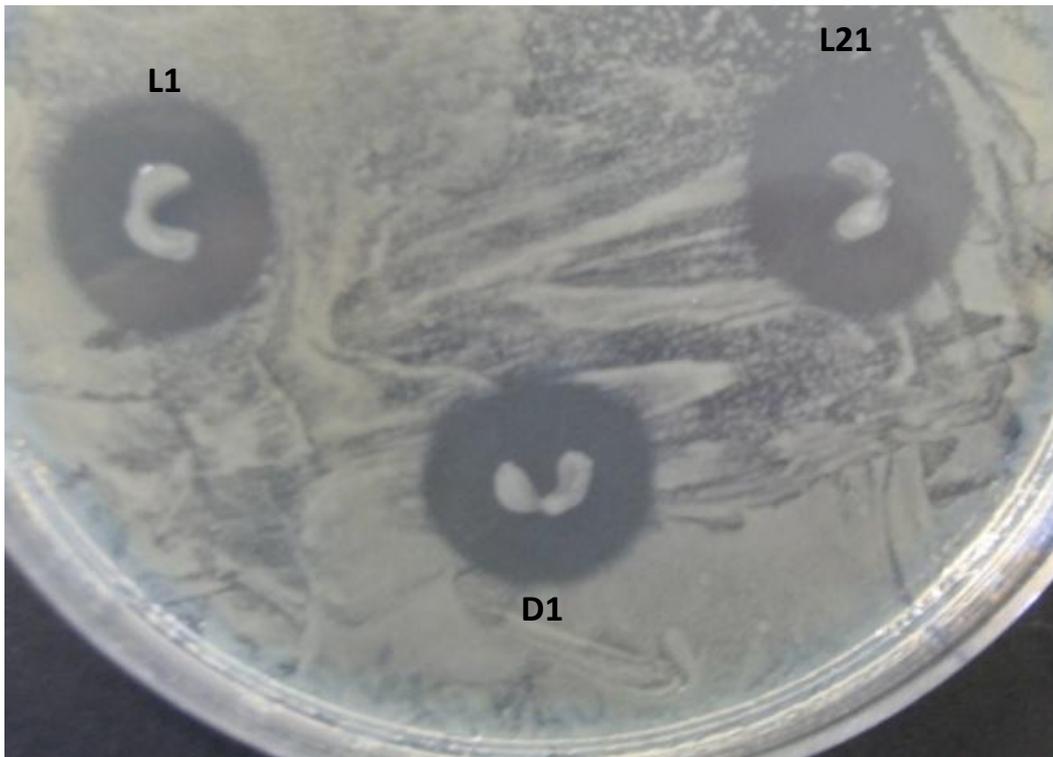
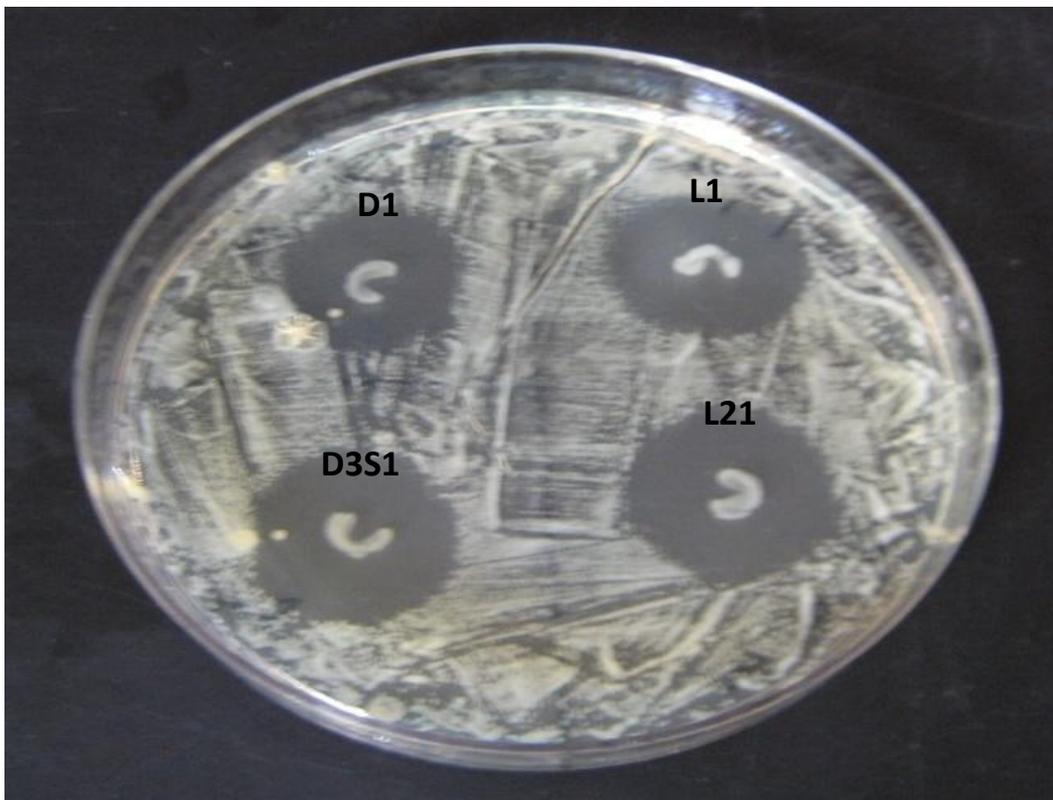


Figura 3.- Inhibición del crecimiento de las cepas D3S1, D1, L1 y L21 frente al patógeno *Yersinia ruckeri* 955



IV.2.2.- Identificación de las cepas probióticas preseleccionadas

En la tabla siguiente observamos los resultados de la batería de pruebas bioquímicas realizadas a las diferentes cepas preseleccionadas.

Tabla XII.- Resultados de las pruebas convencionales y galerías API 20 Strep (BioMérieux) realizadas para la identificación de las cepas probióticas preseleccionadas

PRUEBAS	CEPAS PROBIÓTICAS											
	D3S1	L1	D1	L21	DG	DP	LC	L2	L3	L6	L12	LL
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Movilidad	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación de:												
Ribosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinosa	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Almidón	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicógeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción de :												
Ácido hipúrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ác. piroglutámico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fosfatasa alcalina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leucina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Gelatinasa	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Reduc. de nitratos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

H₂S: Ácido sulfhídrico
 VP: Prueba de Voges Proskauer

Como podemos observar, varias de las cepas preseleccionadas presentaron el mismo perfil bioquímico, tanto con el sistema API 20 Strep como en las pruebas bioquímicas convencionales, confirmando perfiles fenotípicos idénticos en ambas metodologías. De este modo, obtuvimos que las cepas D3S1, DG y DP, así como las cepas L1, L2, L3, L6, L12, LL, LC presentaron las mismas características fenotípicas, hecho que fue corroborado con la utilización del API 50 CH que analiza la fermentación de 50 carbohidratos diferentes (Tabla XIII). En base a estos resultados, el total de 12 cepas que inicialmente preseleccionamos quedó reducido a solo 4 al presentar exactamente el mismo

perfil fenotípico en base al total de 62 pruebas bioquímicas analizadas. A partir de este momento, las cepas preseleccionadas fueron reagrupadas y asignadas como cepa D1 (aislada de dorada), L21 (aislada de lenguado), L1 (aislada de dorada, lubina y corvina) y D3S1 (aislada de dorada).

Figura 4.- Crecimiento y tinción de las 4 cepas preseleccionadas como probióticos, tras 24 horas de incubación. **A** Morfología de las colonias en medio BHIA. **B**, **C** y **D** Tinción de Gram y observación microscópica (100 x)

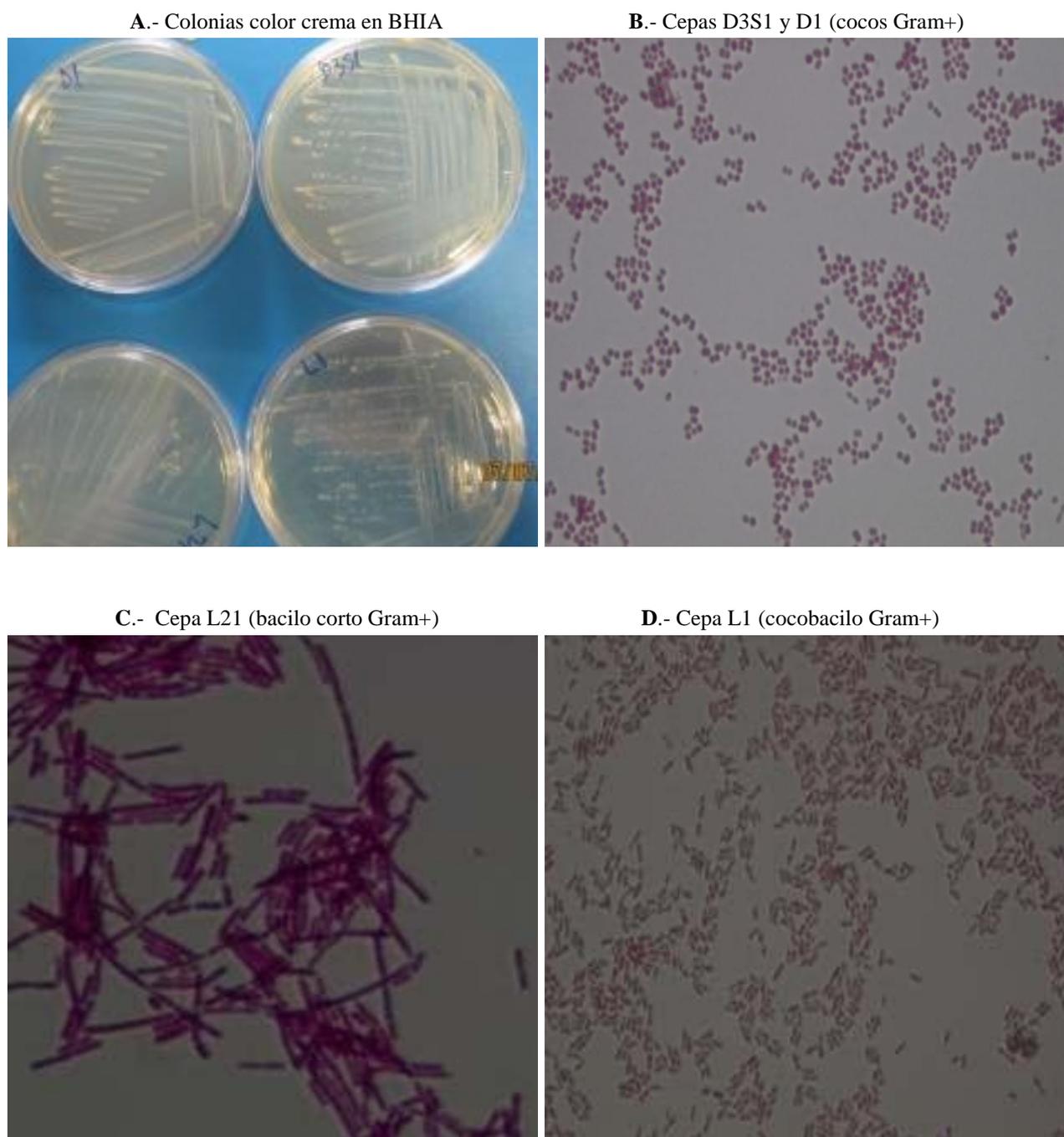
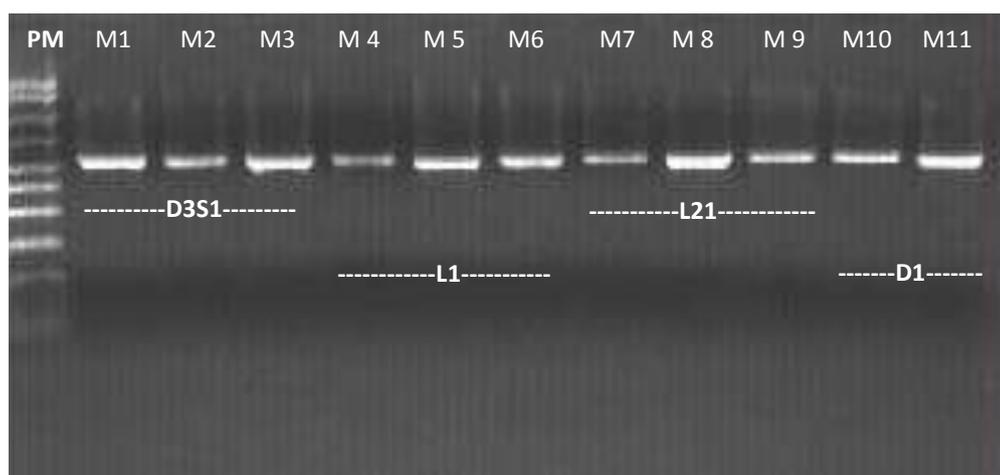


Tabla XIII.- Resultado del metabolismo de carbohidratos de las cepas preseleccionadas mediante el sistema miniaturizado API 50 CH (BioMérieux)

PRUEBAS	CEPAS PROBIÓTICAS											
	D3S1	L1	D1	L21	DG	DP	LC	L2	L3	L6	L12	LL
Glicerol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D- Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinosa	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Ribosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xilosa	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil-Xilopiranosida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructuosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil-manopiranosido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil-glucopiranosido	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
N-Acetilglucosamina	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Amigdalina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Celobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Melezitosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Rafinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Almidón	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicógeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiosa	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D-Turanosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Lixosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatosa	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
D-Fucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato potásico	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2-cetoglunatopotásico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-cetoglunatopotásico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Mediante la realización de pruebas bioquímicas convencionales en tubo y placa no obtuvimos una identificación clara de las 4 cepas en estudio. Por otra parte, mediante el sistema miniaturizado de identificación API 50 CH (BioMérieux) tampoco conseguimos una correcta identificación de las 4 cepas objeto de estudio, mientras que con las galerías API 20 Strep y 32 Strep de BioMérieux solo logramos identificar a 2 de las 4 cepas preseleccionadas. Así, con la galería API 32 Strep, la cepa D3S1 se identificó como *Aerococcus viridans* con un nivel de fiabilidad del 99,9% (código 077700770), mientras que con el API 20 Strep, la cepa L1 se identificó como *Enterococcus faecium* con un nivel de fiabilidad del 99,8% (código 7357555), admitiendo también la posibilidad de corresponderse con *Enterococcus gallinarum* si fuese resistente a la vancomicina. Las otras dos cepas preseleccionadas en este estudio presentaron perfiles dudosos con la galería API 20 Strep, no permitiéndonos una identificación fiable, por lo que recurrimos a la identificación molecular mediante la secuenciación parcial del gen 16S rRNA. En la Tabla XIV observamos el resultado de la identificación de estas 4 cepas, mostrando el porcentaje de homología frente a cepas de referencia. Antes de la secuenciación se confirmó la extracción del ADN bacteriano y la amplificación del mismo con los cebadores universales utilizados, mostrándonos bandas de 500 pb (Figura 5).

Figura 5.- Amplificación del ADN de las 4 cepas seleccionadas con los cebadores universales, antes de realizar la secuenciación



PM.- Marcador de peso molecular (50- 2000 pb)
 Cepa D3S1.- M1, M2, M3
 Cepa L1.- M4, M5, M6
 Cepa L21.- M7, M8, M9
 Cepa D1.- M10, M11

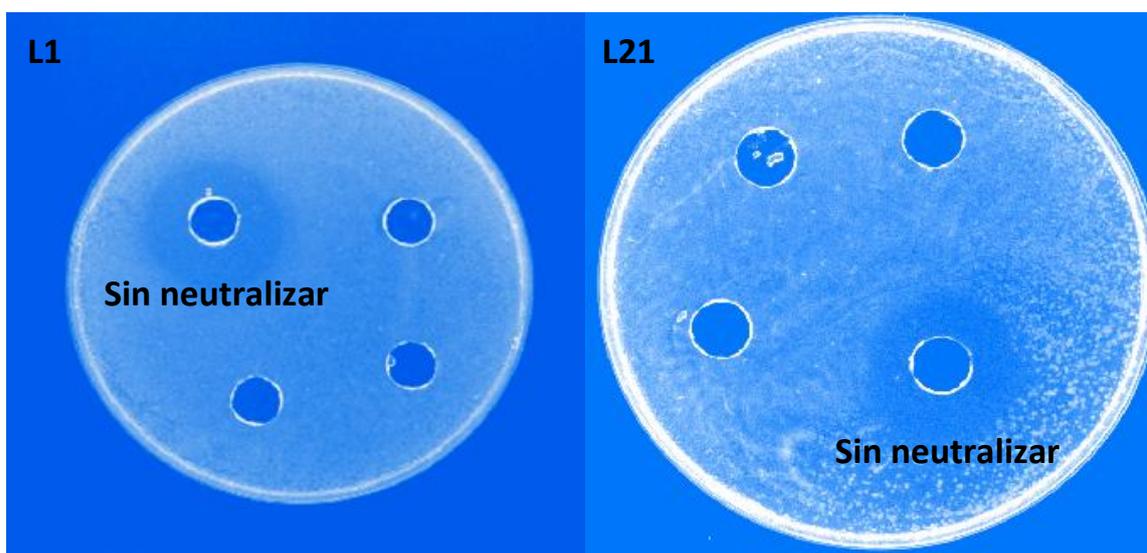
Tabla XIV.- Identificación molecular de las 4 cepas preseleccionadas como probióticas mediante secuenciación parcial del gen 16S rRNA

CEPA	HOMOLOGÍA	IDENTIFICACIÓN	# SECUENCIAS	CEPA TIPO
D3S1	99,8%	<i>Aerococcus viridans</i>	540/542 pb	ATCC 11536
L1	99,9 %	<i>Enterococcus gallinarum</i>	1042/1043 pb	LMG 13129
D1	99,7%	<i>Enterococcus gallinarum</i>	1036/1039 pb	CECT 970
L21	99,5 %	<i>Vagococcus fluvialis</i>	1051/1056 pb	M-29c

IV.2.3.- Producción de sustancias antibacterianas

De los tres métodos utilizados para realizar esta evaluación, en los métodos de doble capa y difusión en disco no obtuvimos resultados positivos, al no observarse halos de inhibición frente a los patógenos analizados. Únicamente en el método de difusión por pocillo se observaron halos de inhibición. En este último método señalado, el sobrenadante sin neutralizar mostró efecto inhibitorio con las 4 cepas probióticas preseleccionadas frente a *V. anguillarum* 975-1 (Figura 6), mientras que para *P. damsela* subsp. *piscicida* 94/99, solo los productos extracelulares sin neutralizar de las cepas *Enterococcus gallinarum* L1, *Enterococcus gallinarum* D1 y *Vagococcus fluvialis* L21 mostraron dicho efecto, lo cual nos indica que dicho efecto inhibitorio observado en los sobrenadantes de las cepas estudiadas podría deberse a la producción de ácidos.

Figura 6.- Producción de sustancias antibacterianas en el pocillo sin neutralizar de la cepa *Enterococcus gallinarum* L1 y *Vagococcus fluvialis* L21 frente a *Vibrio anguillarum*, por el método de difusión en pocillo



IV.2.3.1.- Determinación de compuestos orgánicos en los sobrenadantes bacterianos utilizados

Los resultados de la producción porcentual de compuestos orgánicos realizada mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se muestran en la Tabla XV. Como apreciamos en dicha Tabla, la producción de ácido láctico, glicerol, ácido acético y etanol se presenta como algo habitual en las cepas *Vagococcus fluvialis* L21 y *Enterococcus gallinarum* L1, mientras que en las otras dos cepas probióticas preseleccionadas no detectamos glicerol, y además, en la cepa *Aerococcus viridans* D3S1 tampoco detectamos la producción de etanol. Porcentualmente, la cepa *Vagococcus fluvialis* L21 es la que presenta una mayor concentración de ácido láctico (35,93%), glicerol (6,96%) y etanol (9,53%) mientras que la cepa *Aerococcus viridans* D3S1 presenta el mayor contenido en ácido acético (26,63%). Además, en el sobrenadante también hemos podido observar la presencia de azúcares como la maltosa y glucosa.

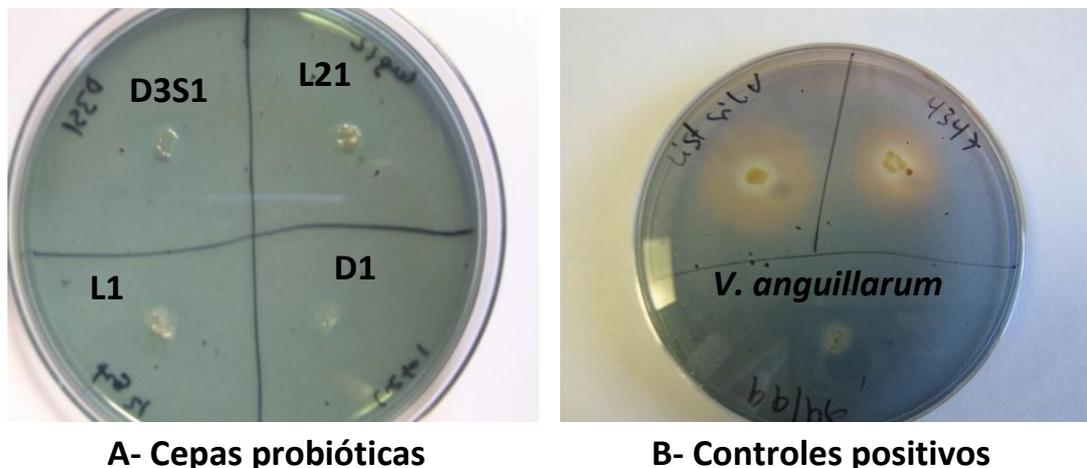
Tabla XV.- Análisis por HPLC de los productos extracelulares de las cuatro cepas probióticas preseleccionadas con efecto antibacteriano (expresado como porcentaje de extracción)

COMPUESTOS	CEPAS PROBIÓTICAS			
	<i>Aerococcus viridans</i> D3S1	<i>Enterococcus gallinarum</i> L1	<i>Enterococcus gallinarum</i> D1	<i>Vagococcus fluvialis</i> L21
Ácido láctico	13,44	24,12	18,38	35,93
Glicerol	0	6,3	0	6,96
Ácido acético	26,63	21,7	19,53	20,01
Etanol	0	7,6	9,01	9,53
Maltosa	31,92	40,28	44,28	8,44
Glucosa	28,01	0	8,8	19,13

IV.2.4.- Competición por nutrientes

La competición por nutrientes se evaluó por dos métodos, la producción de sideróforos y mediante el crecimiento en co-cultivo. Mediante el primer método utilizado, ninguna de las 4 cepas seleccionadas evidenció la producción de sideróforos en el medio Chrome Azurol S, al no producirse el viraje de coloración de azul hacia un halo amarillo alrededor de la cepa analizada por la disminución del hierro presente en el medio, mientras que en los controles positivos pudimos corroborar la efectividad del método utilizado. En la Figura 7 podemos observar el resultado negativo de nuestras cepas y la producción de sideróforos por parte de las cepas de *V. anguillarum* utilizadas como control positivo.

Figura 7- Producción de sideróforos en las 4 cepas preseleccionadas como cepas probióticas y de varias cepas de *V. anguillarum* utilizadas como control positivo



A- Cepas probióticas

B- Controles positivos

El análisis del co-cultivo de las cepas seleccionadas con los patógenos *V. anguillarum* 975-1 y *P. damsela* subsp. *piscicida* 94/99 lo presentamos en la Tabla XVI. Como observamos en dicha Tabla, las 4 cepas probióticas tras 24 horas de incubación junto con las cepas patógenas probadas producen una disminución en el crecimiento de los mismos, pero esta reducción no es estadísticamente significativa ($P > 0,05$) con las cepas probadas. La menor viabilidad de *V. anguillarum* se presenta en el co-cultivo con la cepa *Enterococcus gallinarum* D1 (88,55%), mientras que para *P. damsela* subsp. *piscicida* la menor viabilidad se presenta con la cepa *Vagococcus fluvialis* L21 (92,1%).

Tabla XVI. Efecto de cada cepa probiótica sobre el crecimiento de *V. anguillarum* 975-1 y *P. damsela* subsp. *piscicida* 94/99 en co-cultivo

Cepa probiótica	% Crecimiento en co-cultivo ^a	
	<i>V. anguillarum</i>	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1	95,12 ± 1,29	96,78 ± 1,56
<i>Aerococcus viridans</i> D3S1	96,79 ± 1,44	93,34 ± 1,41
<i>Enterococcus gallinarum</i> D1	88,55 ± 5,77	98,12 ± 2,23
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21	90,15 ± 1,57	92,10 ± 2,33

^aPorcentaje de patógenos (ufc/ml) del crecimiento en co-cultivo comparado con el crecimiento del patógeno en ausencia de la cepa probiótica

IV.2.5.- Resistencia a la bilis

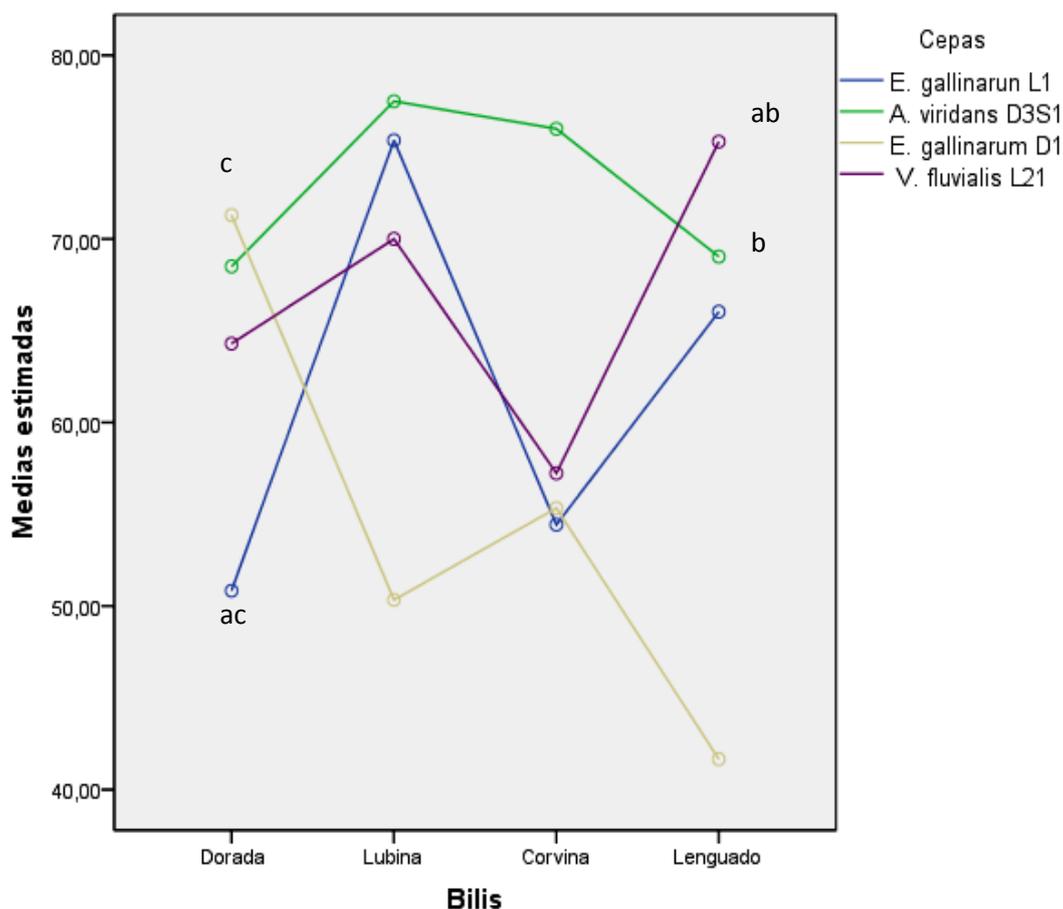
Como observamos en la Tabla XVII, la bilis extraída de las 4 especies de peces utilizadas en esta prueba reducen de manera significativa ($P < 0,05$) la supervivencia de las cepas preseleccionadas tras 90 minutos de contacto con la misma, comparados con el 100% de supervivencia sin bilis, no existiendo diferencias significativas entre la bilis de las distintas especies utilizadas. Además, encontramos que la bilis afecta de forma diferente a cada cepa mostrando valores muy variados en función de la cepa analizada y la especie de pez a la que pertenece la bilis. Como observamos en dicha Tabla, analizando la supervivencia de cada cepa probiótica estudiada encontramos que, usando la bilis de lenguado, los valores máximos y mínimos de supervivencia los encontramos en las cepas *Vagococcus fluvialis* L21 con el 75,3% y *Enterococcus gallinarum* D1 con solo un 41,6%, *Aerococcus viridans* D3S1 (76%) y *Enterococcus gallinarum* L1 (54,4%) con bilis de corvina, *Aerococcus viridans* D3S1 (77,5%) y *Vagococcus fluvialis* L21 (43,3%) con bilis de lubina, y *Aerococcus viridans* D3S1 (71,3%) y *Enterococcus gallinarum* L1 (50,8%) con bilis de dorada. Además, también hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre cepas. En la Tabla XVII y Figura 8 se representan los valores medios de supervivencia de las 4 cepas frente a la bilis de las distintas especies estudiadas.

Tabla XVII.- Porcentaje de supervivencia ($\bar{X} \pm s$) de las cuatro cepas probióticas seleccionadas en bilis de diferentes especies de peces

CEPAS PROBIÓTICAS	ESPECIE DE PEZ				VALOR MEDIO
	Lenguado	Corvina	Lubina	Dorada	
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1	66,0* \pm 5,05	54,4* \pm 6,36	75,7 \pm 6,1	50,8* \pm 8,8	61,72 \pm 11,3
<i>Aerococcus viridans</i> D3S1	69,0* \pm 1,07	76,0 \pm 3,76	77,5 \pm 3,5	71,3 \pm 9,25	73,45 \pm 3,97
<i>Enterococcus gallinarum</i> D1	41,6* \pm 8,42	55,3* \pm 6,03	58,0* \pm 1,3	68,5* \pm 1,67	55,85 \pm 11,0
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21	75,3 \pm 3,4	57,2* \pm 3,26	43,3* \pm 9,4	63,9* \pm 8,57	59,92 \pm 13,3
Valores medios de las cuatro cepas en cada especie estudiada	62,97 \pm 14,7	60,72 \pm 10,2	63,62 \pm 16	63,62 \pm 9	

*Diferencia estadísticamente significativa de cada una de las cepas comparadas con el control (100% supervivencia)

Figura 8.- Valores medios de supervivencia de las 4 cepas de probióticos en la bilis de las diferentes especies de peces estudiadas.



Nota: Las letras representan las diferencias significativas entre cepas ($P < 0,05$)

IV.2.6.- Resistencia a gradientes de pH

En la Tabla XVIII y Figura 9 observamos los porcentajes de supervivencia de las 4 cepas probióticas seleccionadas respecto a los valores de pH. Podemos comprobar cómo a medida que disminuye el pH hasta valores cercanos a 4 se produce, paralelamente, una reducción en la viabilidad mostrada por cada cepa. Así, encontramos que a pH 7 todas las cepas mantienen una viabilidad del 100%, a pH 6 las cepas *Enterococcus gallinarum* L1 y *Enterococcus gallinarum* D1 presentan una viabilidad cercana al 85% en comparación con el pH 7, mientras que las otras 2 cepas analizadas, *Vagococcus fluvialis* L21 y *Aerococcus viridans* D3S1 reducen su viabilidad hasta el 73,6 y 70,1%, respectivamente. A medida que las cepas se ponen en contacto con un medio más ácido, la reducción de la viabilidad bacteriana es mayor, produciéndose en todas ellas, a pH 5, 4 y 3, diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto a su control. Así, podemos observar que a pH 5 la cepa *Aerococcus*

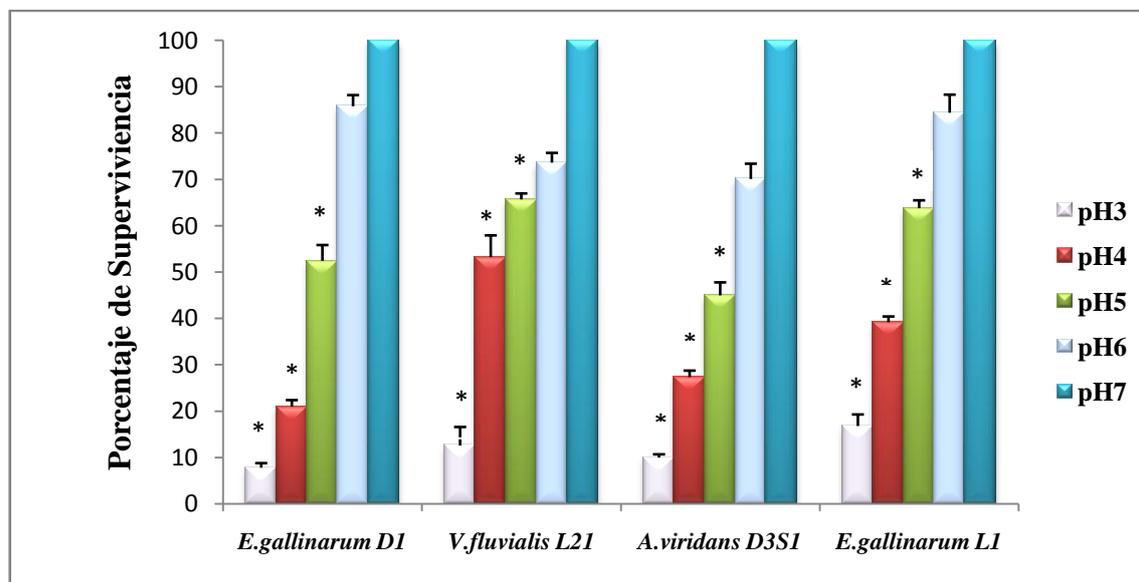
viridans D3S1 presenta una viabilidad del 45%, mientras que *Vagococcus fluvialis* L21 un 65,7%. A pH 4, la cepa que presenta una mayor viabilidad es *Vagococcus fluvialis* L21 con el 53,2%, mientras que *Enterococcus gallinarum* D1 es la que presenta la menor viabilidad a pH 4 (21%). Finalmente, a pH 3 todas las cepas son muy sensibles a la acción del medio ácido, presentando tasas de viabilidad que oscilan entre el 16,8 y 7,8%.

Tabla XVIII.- Porcentajes medios de supervivencia ($\bar{X} \pm s$), de las cuatro cepas probióticas seleccionadas en diferentes valores de pH 3-7

pH	CEPA PROBIÓTICA			
	<i>E. gallinarum</i> D1	<i>V. fluvialis</i> L21	<i>A. viridans</i> D3S1	<i>E. gallinarum</i> L1
pH7	100	100	100	100
pH6	85,8 ± 2,4	73,6 ± 2,1	70,1 ± 3,3	84,4 ± 3,9
pH5	52,4 ± 3,4*	65,7 ± 1,3*	45 ± 2,8*	63,8 ± 1,7*
pH4	21 ± 1,4*	53,2 ± 4,7*	27,3 ± 1,4*	39,2 ± 1,2*
pH3	7,8 ± 1*	12,6 ± 4*	10 ± 0,7*	16,8 ± 2,5*

*Diferencia significativa de cada una de las cepas con respecto al control (pH 7)

Figura 9.- Viabilidad de las cuatro cepas probióticas estudiadas en una suspensión a pH entre 3 y 7



*Diferencia significativa de cada una de las cepas con respecto al control (pH 7)

IV.2.7.- Hidrofobicidad de la superficie celular

Como se puede apreciar en la Tabla XIX nuestros resultados indican que de las 4 cepas probióticas preseleccionadas, únicamente la cepa *Vagococcus fluvialis* L21 tiene capacidad hidrofóbica al presentar valores positivos, mientras que las otras 3 se consideran hidrofílicas.

Tabla XIX.- Hidrofobicidad de las 4 cepas probióticas preseleccionadas

Cepa probiótica	Hidrofobicidad (%)
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1	-70,5
<i>Aerococcus viridans</i> D3S1	-47,5
<i>Enterococcus gallinarum</i> D1	-54,6
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21	66,1

IV.2.8.- Adhesión al mucus intestinal

La capacidad de adhesión de las 4 cepas probióticas al mucus intestinal de diferentes especies de peces y a otras superficies de control fue analizada por dos métodos diferentes, el primero mediante análisis de la adherencia por radiactividad y el segundo mediante análisis de la adherencia por fluorescencia. Previo a los ensayos para determinar la capacidad de adhesión, mediante la técnica ELISA comprobamos si el mucus intestinal tenía la capacidad de adherirse a la placa. Como podemos observar en la Figura 10, las 4 cepas seleccionadas tienen mayor capacidad de adhesión al mucus intestinal que a superficies inespecíficas de control como la albúmina sérica bovina y el polietileno. En la Tabla XX y Figura 10 se representa el porcentaje de adhesión a diferentes sustratos de las 4 cepas probióticas estudiadas evaluado mediante el método de radiactividad, y en la Tabla XXI y Figura 11 se representan los mismos resultados obtenidos mediante el método de fluorescencia. Hay que destacar que con la aplicación de ambos métodos existen claras diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre la adhesión a superficies de control (ASB y polietileno) y al mucus de los peces. Únicamente no detectamos tales diferencias con la utilización del método por fluorescencia con las cepas *Aerococcus viridans* D3S1 y *Enterococcus gallinarum* D1 en mucus de lenguado, y *Enterococcus gallinarum* D1 en mucus de corvina. De forma general, las 4 cepas probadas presentan diferentes porcentajes de adhesión, dependiendo del mucus y del método evaluado, y

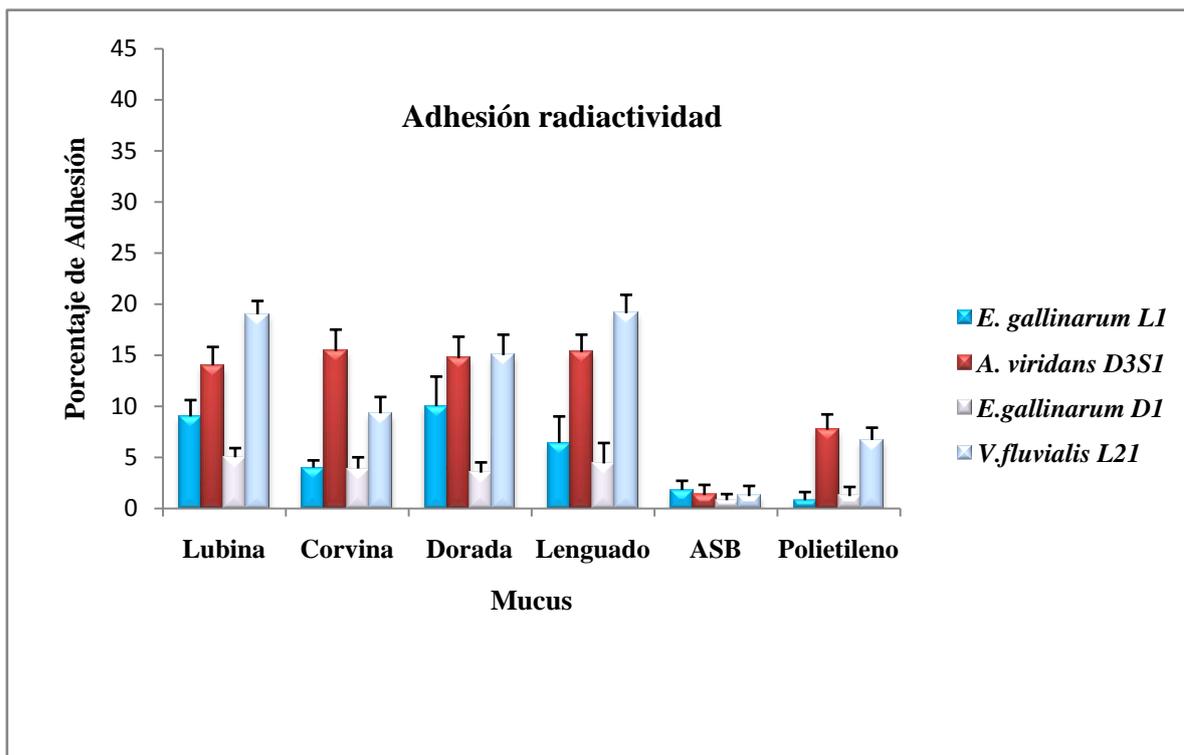
estadísticamente podemos decir que la adhesión se ve afectada por el método, el mucus de la especie de pez probada y las cepas ($P < 0,05$). Así, tenemos que en el método de cuantificación por radiactividad (Tabla XX y Figura 10), *Vagococcus fluvialis* L21 es la que mejor se adhiere al mucus de lubina (19%), lenguado (19,1%) y dorada (15%). En el mucus de corvina, *Aerococcus viridans* D3S1 es la que mayor porcentaje de adhesión presenta (15,4%), mientras *Enterococcus gallinarum* D1 es la que tiene menor porcentaje de adhesión en el mucus intestinal de todas las especies de peces estudiadas. En general, cuando analizamos los valores medios de adhesión de las cepas a los diferentes mucus encontramos que mediante este método, la cepa *Vagococcus fluvialis* L21 es la que mejor se adhiere en todos los mucus con un valor medio global de 15,6%, seguido de *Aerococcus viridans* D3S1 con un 14,8%.

Por otra parte, en el método de determinación de la capacidad de adhesión mediante fluorescencia (Tabla XXI, Figura 11), las 4 cepas se comportan de la siguiente manera. En el mucus de dorada y lenguado, la cepa *Vagococcus fluvialis* L21 tiene el mayor porcentaje de adhesión (42,5% y 19,4%, respectivamente) seguida en ambos casos por *E. gallinarum* L1. En el mucus de lubina y corvina, *Enterococcus gallinarum* L1 presenta mayor fijación (29,5% y 28,7%, respectivamente) y, finalmente, *Enterococcus gallinarum* D1 es la cepa que muestra un menor porcentaje de adhesión en el mucus intestinal de todas las especies de peces estudiadas. Con este método podemos comprobar que la cepa que mejor se adhiere es *E. gallinarum* L1 con una media global de 27%, seguida a corta distancia por *V. fluvialis* L21 con una media de 23,4%.

Tabla XX.- Porcentaje de adhesión ($\bar{X} \pm s$) de las cuatro cepas preseleccionadas a distintos sustratos, por el método de radioactividad

CEPA PROBIÓTICA	MUCUS				MEDIA GLOBAL ($\bar{X} \pm s$)	CONTROLES	
	Lubina	Corvina	Dorada	Lenguado		ASB	Polietileno
<i>E. gallinarum</i> L1	9 ± 1,6	4 ± 0,7	10 ± 2,9	6,4 ± 2,6	7,3 ± 2,7	1,8 ± 0,9	0,8 ± 0,8
<i>A. viridans</i> D3S1	14 ± 1,8	15,4 ± 2,1	14,7 ± 2,1	15,3 ± 1,7	14,8 ± 0,6	1,3 ± 1	7,70 ± 1,5
<i>E. gallinarum</i> D1	5 ± 0,9	3,9 ± 1,1	3,5 ± 1	4,4 ± 2	4,2 ± 0,6	0,8 ± 0,6	1,2 ± 0,9
<i>V. fluvialis</i> L21	19 ± 1,3	9,3 ± 1,6	15 ± 2	19,1 ± 1,8	15,6 ± 4,6	1,2 ± 1	6,7 ± 1,2

Figura 10.- Representación del porcentaje de adhesión a distintos sustratos de las 4 cepas probióticas estudiadas, mediante el método de radiactividad

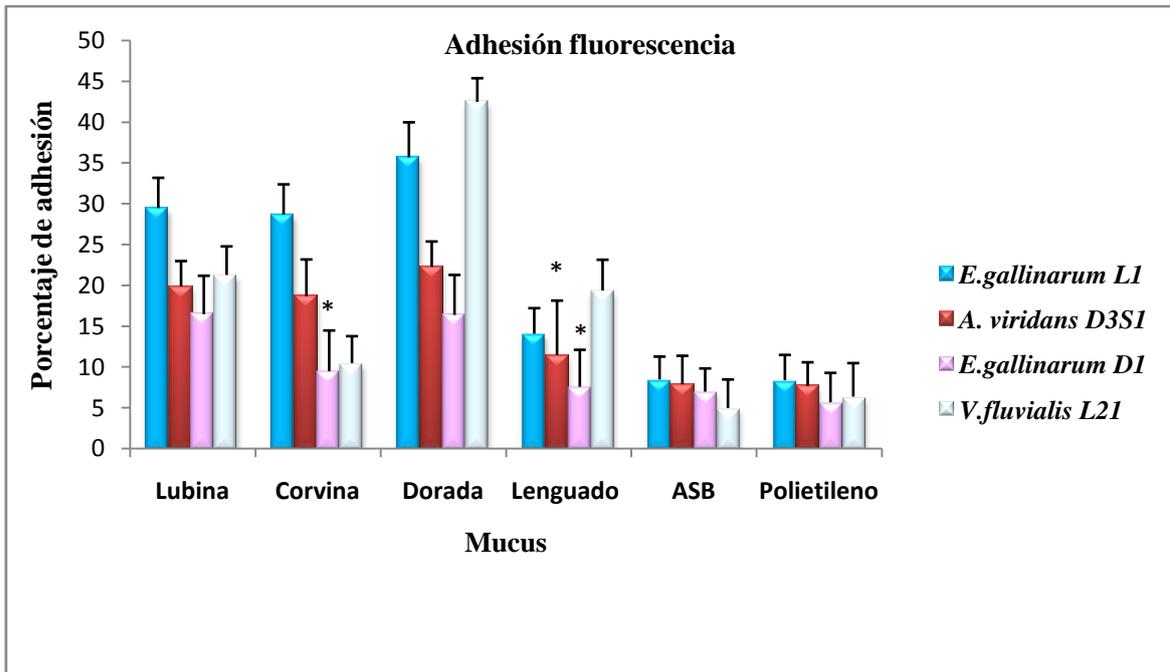


Las barras representan la desviación típica (s)

Tabla XXI.- Porcentaje de adhesión ($\bar{X} \pm s$) de las cuatro cepas probióticas a diferentes sustratos, por el método de fluorescencia

CEPA PROBIÓTICA	MUCUS				MEDIA GLOBAL ($\bar{X} \pm s$)	CONTROLES	
	Lubina	Corvina	Dorada	Lenguado		ASB	Polietileno
<i>E. gallinarum</i> L1	29,5 ± 3,7	28,7 ± 3,7	35,7 ± 4,3	14,1 ± 3,1	27 ± 9,2	8,5 ± 2,8	8,4 ± 3,1
<i>A. viridans</i> D3S1	19,9 ± 3,1	18,7 ± 4,5	22,4 ± 3,1	11,4 ± 6,7	18,1 ± 4,6	7,9 ± 3,5	7,7 ± 2,9
<i>E. gallinarum</i> D1	16,5 ± 4,7	9,5 ± 5	16,5 ± 4,9	7,6 ± 4,5	12,5 ± 4,6	7,0 ± 2,7	5,7 ± 3,6
<i>V. fluvialis</i> L21	21,3 ± 3,5	10,5 ± 3,3	42,5 ± 3,7	19,4 ± 3,7	23,4 ± 13,5	5,0 ± 3,5	6,4 ± 4,1

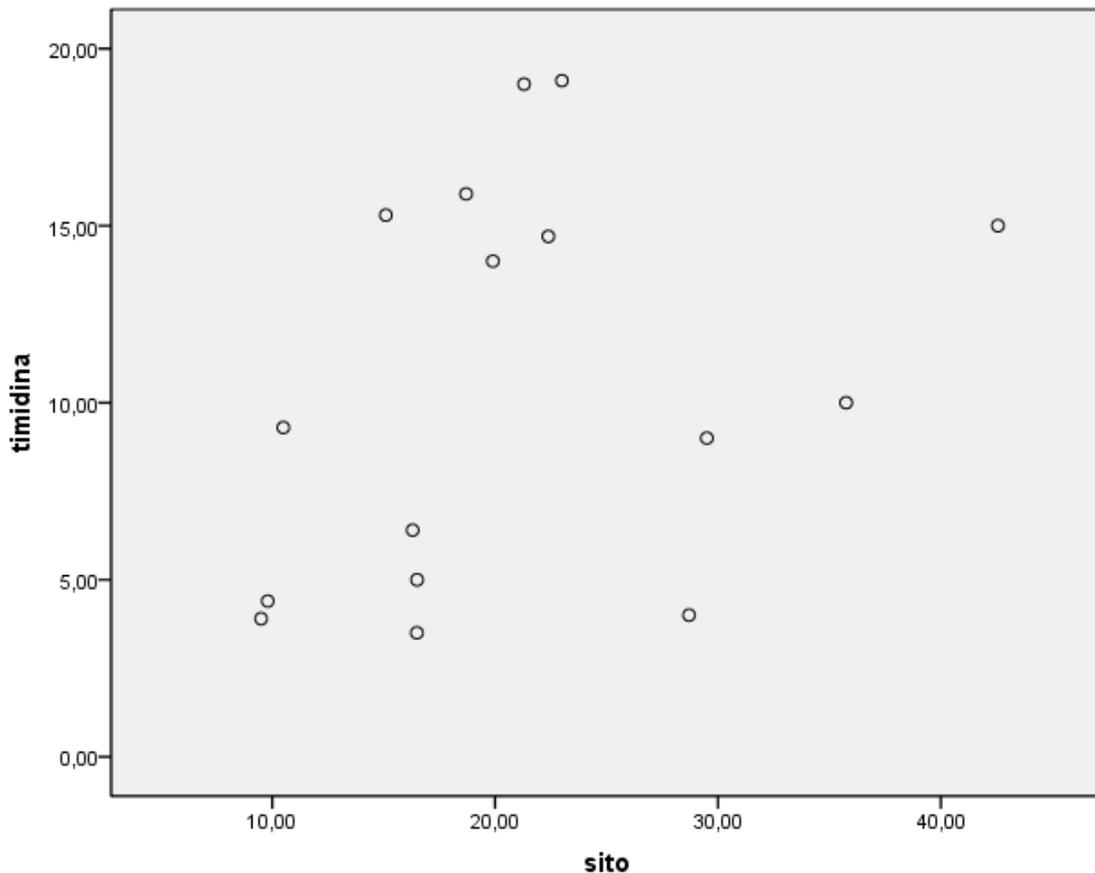
Figura 11.- Representación del porcentaje de adhesión a distintos sustratos de las 4 cepas probióticas estudiadas, mediante el método de fluorescencia



*No existencia de diferencia significativa con referencia a los controles ASB y polietileno

Las barras representan la desviación típica (s)

Figura 12.- Dispersión de los porcentajes medios de adhesión de las 4 cepas probióticas estudiadas mediante los métodos de radioactividad y de fluorescencia



IV.2.9.- Exclusión Competitiva

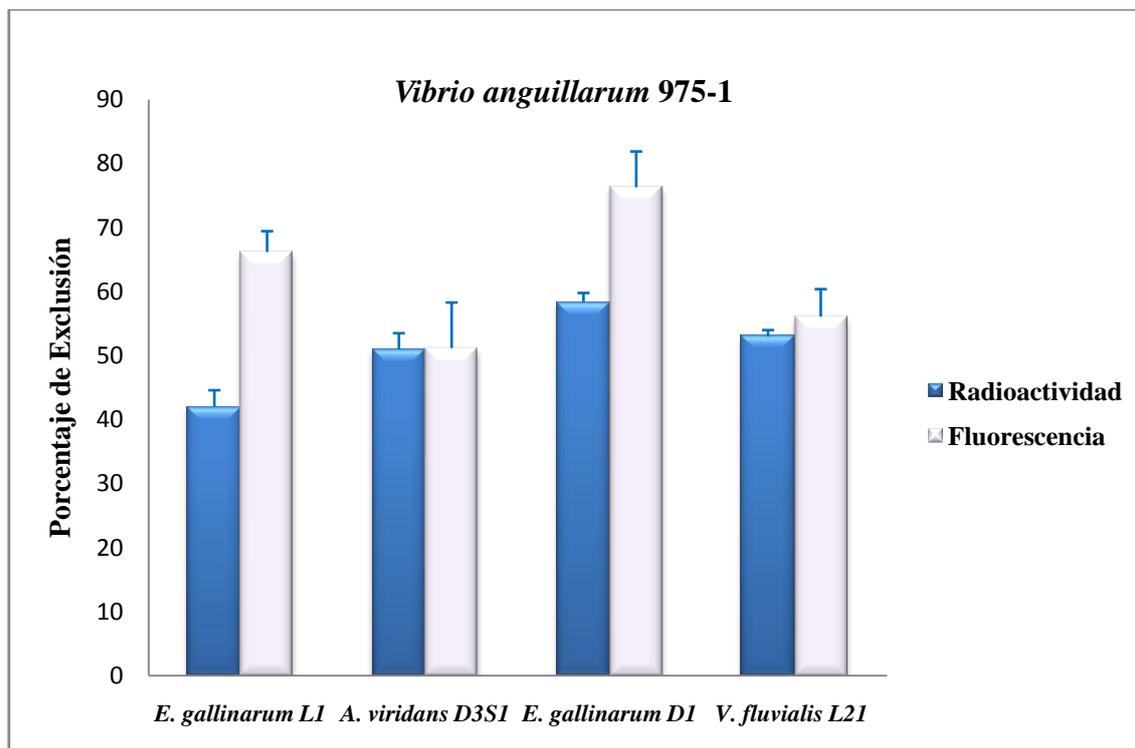
Todas las cepas seleccionadas presentan la capacidad de reducir de manera significativa ($P < 0,05$) la fijación al mucus intestinal de los patógenos probados, *V. anguillarum* 975-1 y *P. damsela* subsp. *piscicida* 94/99, evaluado tanto mediante la determinación de adhesión con radioactividad como con el método que lo evalúa mediante fluorescencia. En las Tablas XXII y XXIII, así como en las Figuras 13 y 14 observamos los porcentajes de exclusión de las cepas patógenas analizadas, evidenciando la competencia ejercida por las cepas probióticas por sitios de fijación a nivel del mucus intestinal.

Por otra parte, también podemos observar que frente a *V. anguillarum* la cepa que produjo una mayor exclusión competitiva fue *Enterococcus gallinarum* D1 (58,3% con el método de radioactividad, y un 76,3% con fluorescencia), mientras que para *P. damsela* subsp. *piscicida* fue *Enterococcus gallinarum* L1, según el método de la radioactividad (57%), y *Vagococcus fluvialis* L21, mediante el método de fluorescencia (54%). De manera general, hemos comprobado que para la exclusión de los dos patógenos probados no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos métodos utilizados ni entre las cuatro cepas estudiadas.

Tabla XXII.- Porcentaje de exclusión ($\bar{X} \pm s$) de *V. anguillarum* 975-1 por la acción de las diferentes cepas probióticas estudiadas, mediante los métodos de radioactividad y de fluorescencia

CEPAS PROBIÓTICAS	% EXCLUSIÓN POR RADIOACTIVIDAD	%EXCLUSIÓN POR FLUORESCENCIA
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1	42 \pm 2,6	66,2 \pm 3,2
<i>Aerococcus viridans</i> D3S1	51 \pm 2,5	51,2 \pm 7,1
<i>Enterococcus gallinarum</i> D1	58,3 \pm 1,5	76,3 \pm 5,6
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21	53 \pm 1,0	56,1 \pm 4,3

Figura 13.- Porcentaje de exclusión de *V. anguillarum* 975-1 por la acción de las diferentes cepas probióticas estudiadas, mediante radioactividad y fluorescencia

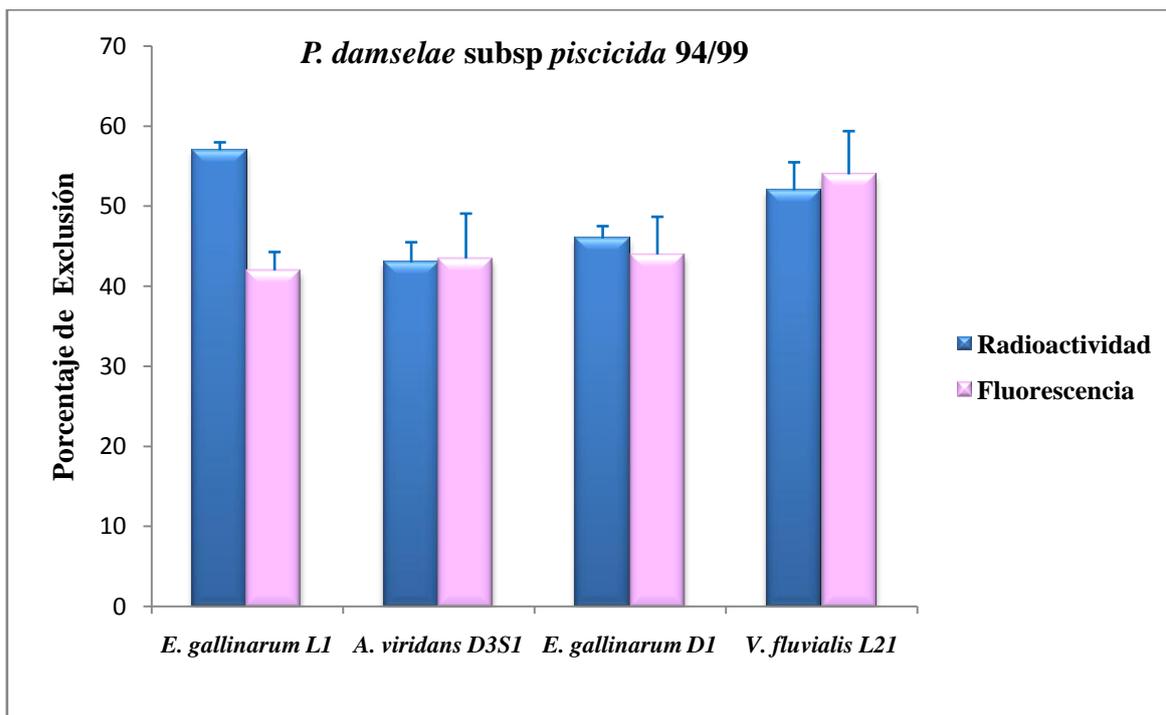


Las barras representan la desviación típica (s)

Tabla XXIII.- Porcentaje de exclusión ($\bar{X} \pm s$) de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 94/99 por la acción de las diferentes cepas probióticas estudiadas, mediante los métodos de radioactividad y fluorescencia

CEPAS PROBIÓTICAS	% EXCLUSIÓN POR RADIOACTIVIDAD	%EXCLUSIÓN POR FLUORESCENCIA
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1	57 ± 1,0	42 ± 2,3
<i>Aerococcus viridans</i> D3S1	43 ± 2,5	43,5 ± 5,6
<i>Enterococcus gallinarum</i> D1	46 ± 1,5	44 ± 4,7
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21	52 ± 3,5	54 ± 5,4

Figura 14.- Porcentaje de exclusión de *P. damsela* subsp. *piscicida* 94/99 por la acción de las diferentes cepas probióticas estudiadas, mediante radioactividad y fluorescencia



Las barras representan la desviación típica (s)

IV.2.10.- Crecimiento en mucus intestinal

Como podemos observar en la Tabla XXIV, las 4 cepas seleccionadas como probióticas tienen la capacidad de utilizar el mucus de dorada, lubina, corvina y lenguado como fuente de nutrientes, produciéndose un crecimiento estadísticamente significativo tras 24 h de incubación. Tras la incubación, todas las cepas aumentaron al menos un logaritmo la concentración bacteriana en el mucus, respecto al control negativo con PBS.

Las cepas que presentaron un mayor crecimiento fueron *Vagococcus fluvialis* L21 y *Aerococcus viridans* D3S1 en el mucus intestinal de dorada y, de nuevo, *Vagococcus fluvialis* L21 en el mucus de lubina. Finalmente, en mucus de corvina, *Enterococcus gallinarum* D1 es la cepa que presenta mayor crecimiento, mientras que con mucus de lenguado, *Aerococcus viridans* D3S1 y *Enterococcus gallinarum* D1, son las cepas que presentan un mayor crecimiento.

Tabla XXIV.- Crecimiento de las 4 cepas probióticas en mucus intestinal de dorada, lubina, corvina y lenguado (expresado en ufc/ml)

CEPA PROBIÓTICA	MUCUS				CONTROLES	
	Dorada	Lubina	Corvina	Lenguado	TSB	PBS
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1	9x10 ⁷	2,7x10 ⁷	1,8x10 ⁷	1,8x10 ⁷	6x10 ⁹	5x10 ⁶
<i>Aerococcus viridans</i> D3S1	2x10 ⁷	8x10 ⁶	2,8x10 ⁶	5,6x10 ⁶	5x10 ⁹	5x10 ⁵
<i>Enterococcus gallinarum</i> D1	4x10 ⁷	1,3x10 ⁷	1,6x10 ⁷	1,7x10 ⁷	2x10 ⁹	2x10 ⁶
<i>Vagococcus fluviialis</i> L21	7x10 ⁷	2,4x10 ⁷	1,7x10 ⁶	2,7x10 ⁶	3x10 ⁹	6,3x10 ⁵

IV.3.- OTRAS CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS PRESELECCIONADAS

En ninguna de las cepas estudiadas se observó la formación de biofilm con los medios de cultivo utilizados. Asimismo, todos los cultivos mostraron actividad hemolítica parcial en agar sangre, pero ninguna cepa mostró actividad proteolítica en medio con caseína, y únicamente *Vagococcus fluviialis* L21 produce gelatinasa. Por otra parte, como observamos en la Tabla XXV, solo la cepa *Enterococcus gallinarum* D1 produce lipasa, siendo a su vez la cepa con mayor actividad enzimática con la galería API Zym (BioMérieux). Ninguna de las 4 cepas estudiadas presenta actividad tripsina, β -glucuronidasa, α -manosidasa ni α -fucosidasa.

Tabla XXV.- Resultados de la actividad enzimática de las diferentes cepas bacterianas preseleccionadas como probiótico con el sistema API Zym (BioMérieux)

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	CEPAS PROBIÓTICAS			
	<i>Enterococcus gallinarum</i> L1	<i>Aerococcus viridans</i> D3S1	<i>Enterococcus gallinarum</i> D1	<i>Vagococcus fluvialis</i> L21
Fosfatasa alcalina	-	+	+	-
Esterasa (C4)	+	+	+	+
Esterasa lipasa (C8)	+	+	+	+
Lipasa (C14)	-	-	+	-
Leucina arilamidasa	+	+	+	+
Valina arilamidasa	+	+	+	+
Cistina arilamidasa	-	-	+	-
Tripsina	-	-	-	-
α -quimotripsina	+	-	+	+
Fosfatasa ácida	+	+	+	+
Naftol-AS-BI-fosfato	+	+	+	+
α -galactosidasa	+	+	-	-
β -galactosidasa	+	-	+	-
β -glucuronidasa	-	-	-	-
α -glucosidasa	-	+	+	+
β -glucosidasa	-	+	-	-
N-acetil-glucosaminidasa	+	-	+	-
α -manosidasa	-	-	-	-
α -fucosidasa	-	-	-	-

IV.3.1.- Patrón de sensibilidad antibiótica

En la Tabla XXVI se pueden apreciar los resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana de las 4 cepas estudiadas como probiótico. Todas las cepas mostraron patrones diferentes para los antibióticos y quimioterápicos evaluados, siendo la cepa *Enterococcus gallinarum* L1 la que presenta un mayor número de resistencias antibióticas. Como se observa en dicha tabla, todas las cepas presentan resistencia antibiótica frente a la kanamicina, trimetoprim, cefoxitina y cefalotina, mientras que todas mostraron sensibilidad antibiótica frente a la novobiocina y a la gentamicina.

Tabla XXVI.- Perfil de sensibilidad/resistencia antibiótica de las 4 cepas preseleccionadas como cepas probióticas

ANTIBIÓTICO	CEPAS PROBIÓTICAS			
	<i>Enterococcus gallinarum</i> L1	<i>Aerococcus viridans</i> D3S1	<i>Enterococcus gallinarum</i> D1	<i>Vagococcus fluvialis</i> L21
Eritromicina 15 µg	S	R	I	S
Penicilina 10 U	I	S	S	S
Estreptomina 10 µg	R	R	S	R
Kanamicina 30 µg	R	R	R	R
Flumequine 30 µg	R	R	R	I
Vancomicina 5 µg	R	S	S	S
Bacitracina 10 U	I	S	S	I
Trimetoprim 5µg	R	R	R	R
Gentamicina 30 µg	S	S	S	S
Cefalexina 30 µg	R	I	S	I
Cefoxitina 30 µg	R	R	R	R
Amoxicilina 30 µg	I	S	S	S
Cefalotina 30 µg	R	R	R	R
Novobiocina 30 µg	S	S	S	S

S: sensible

I: sensibilidad intermedia

R: resistente

IV.3.2.- Perfil de ácidos grasos

Las 4 cepas seleccionadas presentan un amplio perfil en su composición de ácidos grasos (Tabla XXVII), de los cuales, la cepa *Enterococcus gallinarum* D1 presenta el mayor porcentaje de ácidos grasos saturados con un 63,71% mientras que la cepa *Vagococcus fluvialis* L21 muestra la mayor concentración de ácido oleico (18:1n-9) con un 15,22%. Asimismo, en *Enterococcus gallinarum* L1 hallamos la mayor concentración de ácido araquidónico (20:4n-6) con un 46,25% perteneciente al grupo de ácidos grasos omega 6 y ácido docosahenoico (22:6n-3) con 25,06% perteneciente al grupo omega 3.

Tabla XXVII- Perfil de ácidos grasos de las 4 cepas preseleccionadas como probióticas

ÁCIDOS GRASOS	CEPAS PROBIÓTICAS			
	<i>Enterococcus gallinarum</i> L1	<i>Aerococcus viridans</i> D3S1	<i>Enterococcus gallinarum</i> D1	<i>Vagococcus fluvialis</i> L21
14:0	0,65	6,23	6,45	6,71
15:0	1,91	2,58	5,09	1,31
16:0	3,99	26,02	38,20	13,81
17:0	0,03	0,18	0,26	0
18:0	14,33	17,83	10,95	10,55
20:0	0	1,83	1,94	5,97
Total saturados	20,91	54,67	62,89	38,35
16:1n-7	0,57	7,87	9,05	4,49
16:1n-5	0,02	0,16	0,47	0,17
18:1n-9 (ácido oleico)	0,95	10,21	6,57	15,22
18:1n-7	3,10	1,51	5,35	2,51
18:1n-5	0	0,30	0	0,34
20:1n-9	0	1,06	0,33	1,07
22:1n-11	0	0,91	0,84	4,75
22:1n-9	0	0,32	0,36	0,09
15:1n5	0		0,23	
Total monoenes	4,64	22,34	23,2	28,64
18:2n-6	0,52	4,51	3,12	2,86
18:3n-6	0	0,10	0,18	3,5
20:2n-6	0,60	0,37	0	0,25
20:3n-6	0	0	0,30	4,33
20:4n-6(ácido araquidónico)	46,25	0,59	0,05	0,40
22:4n-6	0			
16:2n-6	0,05	0,13	0	3,54
22:5n-6	0,47			
Total n-6 PUFA	47,89	5,7	3,65	14,88
16:3n-3	0,04	0,06	0	0,16
16:4n-3	0	0,14	0	1,42
18:3n-3	0,09	1,12	0,72	0,13
18:4n-3	0	0,81	0,26	0,28
20:5n-3	0,24	2,58	1,28	2,09
22:5n-3	0	0	0,27	0,45
22:6n-3 (ácido docosahenoico)	25,06	5,86	2,91	7,6
20:3n-3	0,05	0,18	0	0
20:4n-3	1,00	0,14	0	0
Total n-3 PUFA	26,92	10,89	5,44	12,13
Total n-3/n-6	74,37	16,59	9,1	27,01
n-3 HUFA	26,35	8,76	4,46	10,14

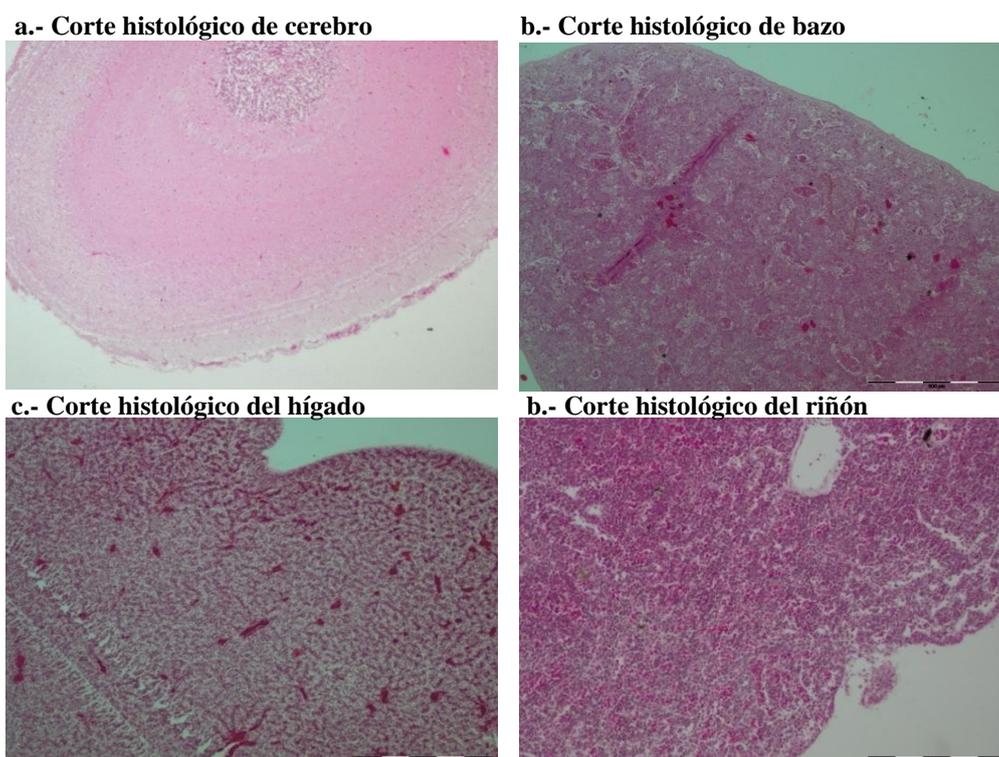
IV.4.- ENSAYOS *IN VIVO*

Al evaluar la viabilidad de la bacteria en el pienso, encontramos que solo las cepas *Enterococcus gallinarum* L1, *Enterococcus gallinarum* D1, y *Vagococcus fluvialis* L21 mantuvieron su concentración en el pienso durante un periodo de 20 días a 4°C, mientras que *Aerococcus viridans* D3S1 después de una semana comenzó a reducir su concentración en el pienso. En base a estos resultados, la dieta experimental con cada una de las cepas se preparó cada 3 días, manteniendo una concentración final aproximada de 10^9 ufc por gramo de pienso para cada una de las cepas estudiadas.

IV.4.1.- Inocuidad de las cepas probióticas preseleccionadas

Durante las 4 semanas que duró la experiencia de determinación de la inocuidad de las cepas probióticas, ninguna de las 4 cepas analizadas, *Enterococcus gallinarum* L1, *Aerococcus viridans* D3S1, *Enterococcus gallinarum* D1 y *Vagococcus fluvialis* L21, provocó signo alguno de enfermedad en los peces inoculados. Todos los peces mostraron un estado saludable, sin signos externos o internos de enfermedad. En el estudio histológico del hígado, bazo, riñón y cerebro de los peces inoculados no se encontró alteración alguna en la estructura de los órganos (Figura 15).

Figura 15.- Cortes histológicos de diferentes órganos de peces inoculados con las cepas probióticas estudiadas (muestras correspondientes al lote inoculado con *E. gallinarum* L1)



IV.4.2.- Efecto protector del probiótico frente a una infección con *Vibrio anguillarum*

Para evaluar el efecto protector de las cepas seleccionadas, se realizó un ensayo de protección a pequeña escala, y únicamente las cepas *Enterococcus gallinarum* L1 y *Vagococcus fluvialis* L21 mostraron un posible efecto protector en este ensayo preliminar, por lo que usamos estas dos cepas para realizar el ensayo completo, y así determinar el efecto protector de estas cepas probióticas en la lubina, frente a la infección experimental con *V. anguillarum* 975-1.

En el ensayo final de protección, tras 8 horas de infección por baño con el patógeno, algunos de los peces infectados comenzaron a presentar signos externos de la enfermedad, como septicemia hemorrágica, opacidad corneal, descamación y úlceras en la piel al tercer día post-infección (Figuras 16, 17, 18). La mortalidad fue atribuida a *Vibrio anguillarum* debido a que en todas las muestras analizadas de hígado, bazo, riñón y cerebro de los peces experimentales se aisló la cepa inoculada, confirmando posteriormente su identificación mediante la galería de identificación API 20 E (Figura 19) y PCR (Figura 20). A nivel histológico no pudimos observar daños internos concluyentes.

Terminado el tiempo de evaluación de 20 días del efecto protector de las cepas probióticas utilizadas, comprobamos que los lotes de lubina previamente alimentados con los probióticos seleccionados (*Vagococcus fluvialis* L21 y *Enterococcus gallinarum* L1) mostraron mayor supervivencia, con un 82,7% y 76%, respectivamente, comparadas con el control positivo de infección (que solo recibió la dieta comercial sin probiótico), que presentó un 70% de supervivencia. Estos datos se traducen en un porcentaje relativo de supervivencia (PRS) del 42,3% para *Vagococcus fluvialis* L21 y un PRS del 20% para *Enterococcus gallinarum* L1. Como puede apreciarse en la Figura 21, estos porcentajes de supervivencia solo mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control positivo de infección en el lote de lubinas alimentado previamente con la cepa de *Vagococcus fluvialis* L21, utilizada como probiótico.

Figura 16.- Opacidad corneal y hemorragia en lubinas infectadas con la cepa *V. anguillarum* 975-1



Figura 17.- Úlceras en la piel de lubinas infectadas con la cepa *V. anguillarum* 975-1



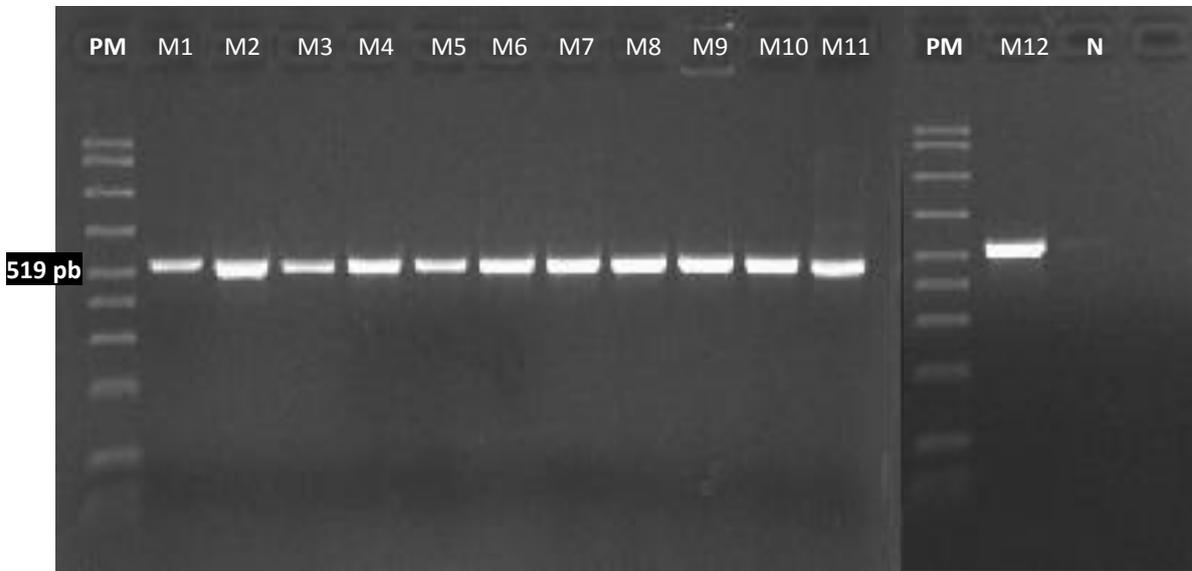
Figura 18.- Signos de septicemia hemorrágica en lubinas infectadas con la cepa *V. anguillarum* 975-1



Figura 19.- Identificación de *V. anguillarum* mediante el perfil API 20 E (BioMérieux)



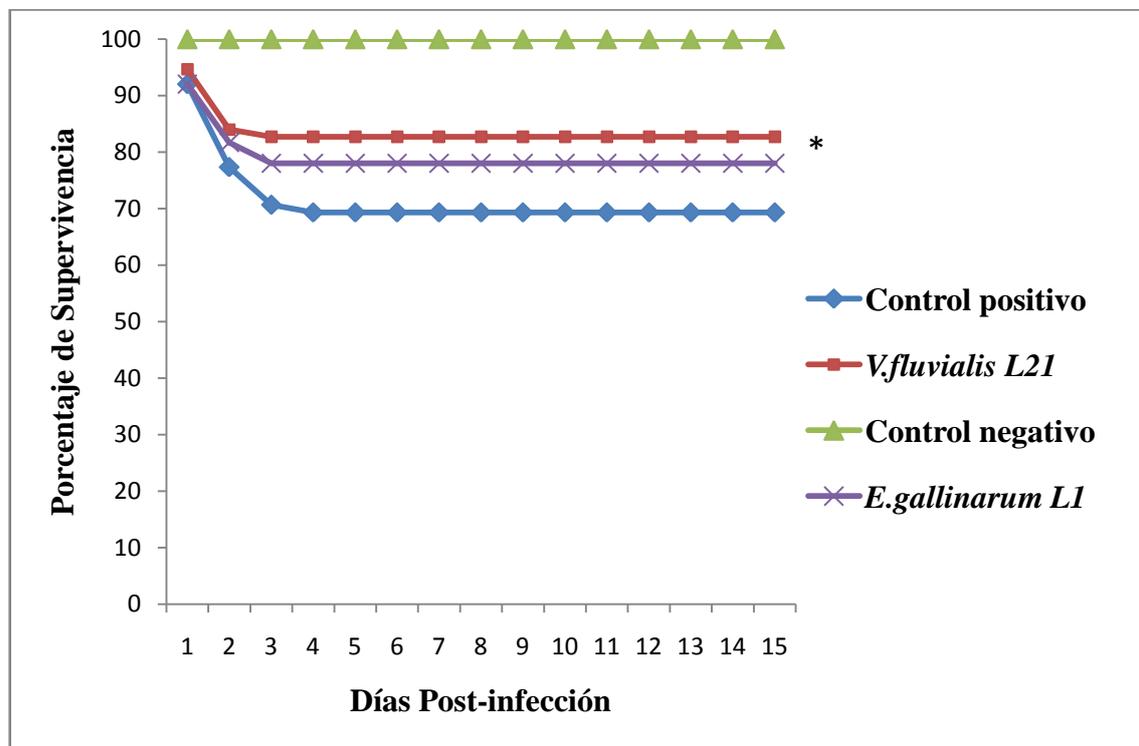
Figura 20.- Confirmación de *V. anguillarum* 975-1 mediante PCR a partir de muestras de órganos internos de los peces infectados



PM.- Marcador de peso molecular (50-2000 pb)
M1-2-3.- Hígado, bazo cerebro pez 1
M4-5-6.- Hígado, bazo cerebro pez 2

M7-8-9.- Hígado, bazo cerebro pez 3
M10-11-12.- Hígado, bazo cerebro pez 4
N.- Control negativo de la PCR

Figura 21.- Porcentaje de supervivencia de lubinas previamente alimentadas con los probióticos *Vagococcus fluvialis* L21 y *Enterococcus gallinarum* L1, frente a la infección por *Vibrio anguillarum* 975-1



*Diferencias estadísticamente significativas respecto al control positivo de infección.

De todos los muestreos microbiológicos realizados durante el tiempo que duró la experiencia de protección, solo se logró reaislar del intestino las cepas probióticas seleccionadas durante el tiempo de alimentación con la dieta experimental, y hasta 48 horas después de haber dejado de alimentar, encontrando concentraciones de $2,9 \times 10^5$ ufc/gramo de contenido intestinal para *Vagococcus fluvialis* L21 y $5,2 \times 10^6$ ufc/gramo para la cepa *Enterococcus gallinarum* L1. Después de este periodo, estas cepas no son viables o se encuentran en muy pequeñas cantidades que no fuimos capaces de reaislar a partir del intestino.

IV-DISCUSIÓN



V.- DISCUSIÓN

La acuicultura es una actividad con más de dos mil años de antigüedad que ha experimentado un rápido crecimiento en los últimos años, pero su rentabilidad se puede ver afectada por la aparición de diferentes brotes de enfermedades infectocontagiosas asociadas a la intensificación de la producción unido a un manejo higiénico-sanitario deficiente. Para contrarrestar este problema, es muy común la utilización de antibióticos, muchas veces de manera inadecuada. Pero debido a las limitaciones en el uso de estos productos por parte de la Unión Europea, hoy en día se trabaja en el desarrollo de herramientas biológicas para el control de enfermedades infecciosas en la acuicultura, como son el desarrollo de nuevas vacunas, inmunoestimulantes y con microorganismos vivos a los que llamamos probióticos.

Los probióticos se presentan como una opción respetable con el medio ambiente. Su uso en acuicultura se implementa después de analizar que microorganismos provenientes del tracto intestinal de peces sanos o del medio ambiente presentan efecto antagónico frente a diferentes agentes patógenos de la acuicultura (Hjelm y col., 2004; Makridis y col., 2005) presentándose este mecanismo como una herramienta muy prometedora para su uso.

La utilización de probióticos en acuicultura es reciente y no tiene más de tres décadas. Sin embargo, en humanos los primeros conocimientos con base científica surgieron en los años 60 siendo introducido por primera vez el término “probiótico” en 1965 por Lilly y Stillwell, para posteriormente comenzar su aplicación en animales terrestres.

Existen numerosos estudios sobre el uso de cepas probióticas en el medio marino, y han sido evaluadas en diferentes especies como peces, moluscos, crustáceos, equinodermos y alimento vivo como artemia, algas y rotíferos (Verschuere y col., 2000a; Irianto y Austin, 2002; Kesarcodi-Watson y col., 2008).

La evaluación y caracterización de una cepa probiótica se realiza mediante el análisis de su mecanismo de acción y el efecto producido sobre el hospedador. Dicho mecanismo de acción puede ser mediante la producción de efecto inhibitorio del

crecimiento sobre agentes patógenos, competición por nutrientes disponibles, competición por sitios de fijación a nivel intestinal, actividad enzimática, beneficios nutricionales, mejora de la calidad del agua y por la estimulación del sistema inmunológico. Estas funciones pueden actuar por sí solas o combinadas, ayudando a mantener a los peces en un estado saludable (Wang y col., 2008b). Las bacterias Gram-positivas representan el grupo predominante de probióticos en acuicultura, en especial las bacterias ácido lácticas, y diferentes especies del Género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. circulans*). Dentro del grupo de las bacterias Gram negativas, los Géneros *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas* y algunos géneros de la Familia *Enterobacteriaceae* han sido igualmente utilizadas en acuicultura (Nayak, 2010).

V.1.- NUEVAS CEPAS PROBIÓTICAS PARA LA PISCICULTURA MARINA

En nuestro estudio hemos trabajado con cuatro especies diferentes de peces que se cultivan en el Archipiélago Canario, dorada, lubina, corvina y lenguado, con el objetivo de seleccionar diferentes cepas con actividad probiótica que pudiera extender su uso a todas ellas. La selección de cepas probióticas se realiza analizando las diferentes propiedades que debe cumplir una cepa para que sea considerada como potencial cepa probiótica. En nuestro estudio hemos evaluado cada uno de estos mecanismos mediante las diferentes metodologías existentes para obtener un mejor conocimiento de los mismos. Además, para su consideración como candidata probiótica hemos realizado su evaluación tanto *in vitro* como *in vivo*. La primera preselección se realiza analizando la capacidad de producir efecto inhibitorio del crecimiento frente a uno o varios patógenos seleccionados. Mediante la toma de muestras en los peces seleccionados, aislamos un total de 523 cepas bacterianas a partir de branquias e intestino de los peces muestreados, pero solo 15 presentaron la capacidad de inhibir el crecimiento de una o varias de las cepas patógenas seleccionadas utilizadas en el estudio. Tras el almacenamiento, 3 cepas dejaron de manifestar dicha inhibición del crecimiento frente a cepas patógenas. Esta pérdida de la actividad inhibitoria ha sido descrita en otros estudios, sugiriendo que la pérdida de la capacidad inhibitoria tras el periodo de almacenamiento o subcultivos continuados, se debía a que la producción de sustancias extracelulares con efectos inhibitorio solo se presentaba si la bacteria tenía a su disposición todos los nutrientes esenciales para su crecimiento y reproducción (Olsson y col., 1992), por lo que este hecho era de suma importancia a la hora de seleccionar y caracterizar cepas probióticas en acuicultura (Vine y col., 2006; Ringo y col., 2010).

Una vez realizada la caracterización bioquímica de estas 12 cepas, observamos, que realmente solo se trababan de 4 cepas, todas ellas cocos Gram positivos, catalasa y oxidasa negativo. Tras la secuenciación parcial del gen 16S rRNA, identificamos a estas cuatro cepas como *Vagococcus fluvialis* (cepa L21, aislada de lenguado), *Aerococcus viridans* (cepa D3S1 aislada de dorada), y dos cepas diferentes de *Enterococcus gallinarum*, (cepa L1 aislada de dorada) y *Enterococcus gallinarum* (cepa D1 aislada de dorada, corvina y lubina), todas ellas pertenecientes al grupo de bacterias ácido lácticas.

La microbiota intestinal de los peces está relacionada con su medio ambiente externo y las bacterias ingresan constantemente al pez a través de procesos de osmoregulación y a través del alimento (Kesarcodi-Watson y col., 2008). Las especies identificadas en nuestro estudio, pertenecientes al grupo de bacterias ácido lácticas, no se han descrito como parte de la microbiota intestinal en peces marinos, pero los géneros bacterianos a los que pertenecen, se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza formando parte del tracto intestinal de humanos y animales terrestres, plantas, suelo, o aguas residuales, debido a su capacidad de crecer y sobrevivir bajo condiciones ambientales muy severas (Barbosa y col., 2010). Estas características sugieren que podría ser normal encontrarlas tanto en peces marinos como en peces de agua continental como indica Gatesoupe (2008). Así, diferentes especies del Género *Enterococcus* han sido aisladas de ambientes marinos por su capacidad de tolerar altas concentraciones de sales (Hardwood y col., 2000), al igual que en el intestino de peces cultivados en granjas integradas (Pedersen y Dalsgaard, 2003). Además, *Enterococcus* spp. también se ha aislado de productos alimenticios como carne molida (Shewmaker y col., 2004) y en el proceso de deterioro de camarones cocidos (Jaffrés y col., 2009).

Por otra parte, el Género *Vagococcus* ha sido aislado de diferentes fuentes como aguas residuales, heces de animales domésticos como cerdos, pollos, gatos, mamíferos acuáticos como focas, marsopas y nutrias, así como a partir de muestras clínicas en humanos (Hoyle y col., 2000; Lawson y col., 2007). Mientras que *Aerococcus viridans* es a menudo considerado como un contaminante del aire, también está presente en diferentes muestras de agua dulce y agua de mar, suelo, sedimentos marinos, plantas y productos de origen animal (Grant y col., 1992).

Algunas especies de los géneros a los que pertenecen algunas especies seleccionadas en nuestro estudio como posibles probióticos, se describen como patógenos en peces y otras especies animales. Así, *Vagococcus salmoninarum* puede producir mortalidades esporádicas en peces, *Enterococcus gallinarum* y *Aerococcus viridans* pueden producir diferentes cuadros patológicos como infecciones del tracto urinario, endocarditis o meningitis en humanos y animales terrestres como cerdos y vacas. Asimismo, *Aerococcus viridans* es un patógeno conocido del pez doncella (*Coris julis*) y en crustáceos está relacionada con la enfermedad de la gafkemia en langosta (*Homarus americanus*) y en procesos septicémicos en tortugas marinas (Torrent y col., 2002; Martin y col., 2007). Sin embargo, existen especies patógenas para peces como *V. alginolyticus* que se han utilizado como probióticos en crustáceos y en otros peces (Austin y col., 1995; Gómez-Gil y col., 2002), por lo que *a priori* no podemos descartar ninguna de las cepas seleccionadas, realizando una caracterización completa y detallada de cada cepa antes de que sea propuesta como posible probiótico para acuicultura, y después de analizar pormenorizadamente todas las ventajas e inconvenientes de su utilización.

Hasta la fecha, ninguna de las especies y/o géneros bacterianos seleccionados en este estudio se habían utilizado anteriormente como probióticos de peces, a excepción de diferentes especies del Género *Enterococcus*, como por ejemplo *Enterococcus faecium*, que se ha utilizado en larvas de lenguado produciendo una mejora en su tasa de crecimiento, mayor tolerancia al estrés y mayores porcentajes de supervivencia durante su ciclo productivo (Bogut y col., 2000; Avella y col., 2011) y en anguila europea mostrando efecto protector frente a una infección experimental con *Edwardsiella tarda* (Chang y Lui, 2002). Asimismo, el uso de *Enterococcus faecium* aumenta el crecimiento y mejora la respuesta inmune en el cultivo de tilapia (Wang y col., 2008a) y en el cultivo larvario de lenguado (*Solea solea*), modula la respuesta del sistema neuroendocrino (Palermo y col., 2011). Igualmente, *Enterococcus* spp. se ha utilizado como probiótico en juveniles de bacalao (*Gadus morhua*, L) modificando la microbiota intestinal, contribuyendo en el crecimiento y supervivencia de los peces (Lauzón y col., 2010).

En la preselección de cepas probióticas, la capacidad de inhibición del crecimiento frente a patógenos es el primer criterio de selección (Pan y col., 2008). En general, todas las bacterias presentan diferentes mecanismos antagónicos que les permiten permanecer en determinados ecosistemas, aún cuando las condiciones no sean las más favorables. El

grupo de bacterias mayoritariamente utilizadas como probióticas son las bacterias ácido lácticas. Estas bacterias juegan un papel importante en la industria alimenticia por ser capaces de producir sustancias con efecto antagónico frente a otros microorganismos, y a su vez efectos beneficiosos sobre el hospedador (Kesarcodi-Watson y col., 2008).

En nuestro estudio, las cepas seleccionadas se analizaron frente a diferentes patógenos de la acuicultura marina y continental, pero solo mostraron efecto inhibitorio frente a *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Yersinia ruckeri*. Otras bacterias ácidos lácticas se han usado ampliamente en acuicultura por su capacidad de inhibir el crecimiento de agentes patógenos, y así, diferentes cepas pertenecientes al grupo de bacterias ácido lácticas aisladas de pejerrey (*Odontesthes platensis*) han mostrado efecto inhibitorio frente a *Lactococcus garvieae* (Sequeiros y col., 2010). Dos cepas aisladas en carpa, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis* se han utilizado por producir efecto inhibitorio frente a *Aeromonas salmonicida* (Hagi y col., 2009). Bajo el mismo criterio que el nuestro, Fjelheim y col. (2010) seleccionaron varias cepas de la microbiota intestinal de bacalao como candidatas a probióticos por mostrar *in vitro* efecto inhibitorio frente a *V. anguillarum*. Del mismo modo se aislaron 3 cepas de *Enterococcus* spp. que formaban parte de la microbiota intestinal del sábalo (*Prochilodus argenteus*) por presentar actividad antagónica frente a un amplio rango de bacterias patógenas (Silva y col., 2005). Igualmente, cepas pertenecientes al Género *Carnobacterium*, aisladas de trucha fueron seleccionadas por producir efecto inhibitorio frente a *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus iniae* y *V. anguillarum* (Kim y Austin, 2008). Además, otra cepa de *Carnobacterium divergens* aislada a partir de diversas especies de peces como salmón, bacalao y trucha del ártico también mostró efecto antagónico frente a *Vibrio viscosus* y *Vibrio anguillarum* (Ringo y col., 2010).

La capacidad inhibitoria que producen los productos extracelulares de las cepas probióticas está asociada a diferentes factores como puede ser la producción de bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, lisozimas, proteasas, ácidos orgánicos de cadena corta y diacetilo. Todos estos mecanismos están ampliamente documentados como parte de las bacterias ácido lácticas, siendo utilizados en diferentes industrias (Vallejo y col., 2008). En nuestro estudio, la producción de sustancias inhibitorias por parte de las 4 cepas probióticas fue evaluada frente a los diferentes patógenos empleados por tres métodos diferentes. De los tres métodos analizados, solo pudimos observar un resultado positivo

para la producción de sustancias antibacterianas en el método de difusión en pocillo. Estos resultados coinciden con el trabajo de Olsson y col. (1992) quienes describieron que diversos factores como la temperatura o la composición del medio de cultivo intervienen en la producción de los metabolitos inhibidores, y así, por ejemplo, la actividad de una bacteriocina producida por *Shigella sonnei* se pierde a temperatura ambiente. Asimismo, Sequeiros y col. (2010) demostraron que la actividad antimicrobiana de *Lactococcus lactis* frente a *Lactococcus garvieae* decrece a medida que se incrementa la temperatura de incubación, así como por el tiempo de crecimiento de la bacteria y el medio en el que se cultiva la misma.

No era la finalidad de este trabajo analizar pormenorizadamente el tipo de sustancias antibacterianas que producen las cepas probiótica preseleccionadas. Sin embargo, nos pareció interesante iniciar su estudio en este trabajo, adentrándonos en las características intrínsecas a las bacterias ácido lácticas, donde una de sus propiedades fundamentales suele estar relacionada con la producción de ácidos y compuestos orgánicos. Para ello, nos hemos centrado en analizar los más frecuentes, pero otros ácidos y compuestos orgánicos deberán ser investigados más detalladamente con posterioridad.

Una vez comprobada la producción de sustancias antibacterianas y teniendo en cuenta que los productos extracelulares pueden ser de diversa índole, hemos analizado solo la producción de compuestos orgánicos frecuentes en las bacterias ácido lácticas. Este análisis se realizó utilizando los productos extracelulares de las cuatro cepas mediante cromatografía líquida de alta definición (HPLC), pudiendo observar (Tabla XV) que todas las cepas probióticas analizadas producen ácido láctico y ácido acético a diferentes concentraciones, y que las cepas *Enterococcus gallinarum* L1, *Vagococcus fluvialis* L21 y *Enterococcus gallinarum* D1, producen además, pequeñas cantidades de etanol como producto final de su fermentación, aunque también pudimos detectar bajas concentraciones de glicerol en los productos extracelulares de *Vagococcus fluvialis* L21 y *Enterococcus gallinarum* D1. Es importante destacar la producción de ácido láctico, que se corresponde con el 35% de los compuestos totales analizados, para la cepa *Vagococcus fluvialis* L21. Por otra parte, también hemos encontrado en algunas de estas cepas altas concentraciones de glucosa y maltosa como producto final de su metabolismo.

Nuestros resultados para la producción de ácidos, son comparables con los estudios realizados por Vázquez y col. (2005a) quienes demostraron que la actividad antibacteriana de algunas cepas del grupo ácido láctico frente a bacterias Gram-negativas pertenecientes al Género *Vibrio*, era debida a la producción de ácido láctico y acético, coincidiendo con los resultados obtenidos por Aguirre (1993), aunque debemos recordar que los productos extracelulares pueden ser de diferente índole y que los ácidos orgánicos son solo uno de los mecanismos inhibitorios de las bacterias ácido lácticas. Además, en nuestro estudio no podemos atribuir dicho efecto únicamente a los ácidos orgánicos y al etanol, ya que hay referencias que señalan que cepas pertenecientes al Género *Enterococcus* producen enterocinas pertenecientes al grupo II, que también podrían ejercer un efecto inhibitorio (Sánchez y col., 2010). En nuestro trabajo no hemos analizado la producción de otros compuestos inhibidores como bacteriocinas, lisozimas o peróxido de hidrógeno pero sabemos que estas sustancias podrían actuar de forma conjunta o por separado para producir dicho efecto inhibitorio (Balcázar y col., 2007), o simplemente puede ser que el mecanismo de inhibición de los patógenos por parte de nuestras cepas probióticas se deba a otros procesos multifactoriales, tal y como describen Irianto y Austin (2002).

Por otra parte, como ya hemos señalado, el efecto inhibitorio frente a otros microorganismos no es debido exclusivamente a la producción de productos extracelulares por parte de las cepas probióticas, sino que pueden intervenir otros mecanismos de acción como la competición por nutrientes (Nikoskelainen y col., 2001a). Los microorganismos necesitan de energía para realizar sus funciones vitales, y la obtienen mediante el catabolismo de diversos nutrientes del medio. En un gran número de estudios se ha analizado la producción de sideróforos por parte de microorganismos como agentes de biocontrol antagónico para desplazar e inhibir la proliferación de patógenos por competencia del hierro biodisponible cuando el patógeno utiliza este mismo mecanismo y necesita de este elemento para su crecimiento (Sullivan, 2001). Así, por ejemplo, ciertas levaduras aisladas de ambientes marinos inhiben el crecimiento de *V. anguillarum* y *V. parahemolyticus* mediante la producción de sideróforos (Wang y col., 2009), sugiriéndose por parte de la industria piscícola que en granjas con altas densidades de cultivo se deberían utilizar bacterias con esta capacidad para controlar la proliferación de enfermedades infecciosas (Fgaier y Eberl, 2011). *Pseudomonas fluorescens* ha sido muy utilizada en granjas de peces como agente de biocontrol frente a *V. anguillarum* (Gram y col., 1999). Asimismo, en otro estudio se comprobó que, mediante este mismo mecanismo,

una cepa del Género *Bacillus* sp. inhibía el crecimiento de *V. vulnificus* (Sugita y col., 1998).

En nuestro estudio hemos evaluado la competición por nutrientes de las 4 cepas probióticas preseleccionadas mediante dos métodos distintos, la producción de sideróforos y el crecimiento en co-cultivo. En el ensayo de crecimiento en co-cultivo no hubo una disminución estadísticamente significativa del patógeno con los probióticos probados. Además, ninguna de las cepas produjo sideróforos, por lo que podemos descartar estos dos mecanismos como posibles modos de acción de la inhibición de estas cuatro cepas. Sin embargo, otros mecanismos de competición, si los hubiera, no pueden ser descartados por las razones expuestas anteriormente.

Otro de los requisitos para seleccionar a una cepa como probiótica es que pueda ser capaz de sobrevivir a pH ácidos y a la acción de la bilis, para que al ser administradas a los peces por vía oral, éstas puedan resistir el tránsito gastrointestinal y puedan llegar a colonizar el intestino (Robertson y col., 2000; Irianto y Austin, 2002; Nikoskelainen y col., 2003). Nuestros resultados indican que la viabilidad de las 4 cepas seleccionadas se ve afectada por la acción de la bilis de las diferentes especies de peces, con diferentes tasas de viabilidad, pero debemos tener en cuenta que la concentración de bilis usada (10%) es muy alta comparada con la concentración fisiológica en humanos que es del 3%, pues continúa siendo una incógnita la concentración real de bilis en los peces que puede existir a nivel intestinal por lo que para la realización de este ensayo se realiza una sobreestimación de la concentración de bilis (Nikoskelainen y col., 2001a).

Asimismo, valores de pH ácido afectan la viabilidad de las cuatro cepas de manera significativa, observando tasas de supervivencia del 40% a valores de pH 4. Pero debemos tener en cuenta que las cepas probióticas van mezcladas con el alimento, por lo que la acción de las secreciones del estómago no son directas y, además, en los procesos de digestión intervienen otros elementos como el agua, iones inorgánicos y el número de tomas diarias de alimento (Nikolopoulou y col., 2011).

Además, si las cepas probióticas van a ser utilizadas en periodo larvario no sería necesario la evaluación de la resistencia a pH ácidos ni a la acción de la bilis, ya que en estos estadios temprano de los peces, el pH del estómago es moderadamente alcalino

(Fjellheim y col., 2010) y el tracto digestivo larval aún no está desarrollado completamente, y la bilis no es secretada hasta periodos posteriores del desarrollo (Vine y col., 2006).

La capacidad de los agentes patógenos de adherirse al mucus intestinal de los peces está correlacionada con la virulencia, ya que la colonización del patógeno en el intestino es una posible vía de infección en los peces (Schoers y col., 2008). La adhesión a la mucosa y su posterior crecimiento en el mucus de los probióticos preseleccionados son necesarias para que la bacteria se establezca en el intestino y pueda llegar a colonizarlo (Ouweland y Salminen, 2003; Collado y col., 2007).

En la prueba de adhesión, en general nuestros resultados indican que independientemente del método nuestras cepas muestran una mayor capacidad de adhesión al mucus intestinal que a superficies inespecíficas como el ASB o polietileno, pudiendo observar valores muy diversos que van desde 3,5% para la cepa *Enterococcus gallinarum* D1 en el mucus de dorada a un 19,1% para *Vagococcus fluvialis* L21 en el mucus de lubina, ambos valores obtenidos mediante el método de análisis con radiactividad, mientras que en el método con fluorescencia obtuvimos valores que van desde 7,6% para *Enterococcus gallinarum* D1 en el mucus de lenguado hasta un 42,5% para *Vagococcus fluvialis* L21 en mucus de dorada. Es precisamente esta última cepa la que presenta el valor más alto de adhesión en el mucus intestinal, respecto al resto de las cepas y en todas las especies de peces estudiadas.

La mayor adherencia de una cepa al mucus intestinal de los peces que a superficies inespecíficas ya lo describieron con anterioridad Vine y col. (2004) con diferentes cepas aisladas de pez payaso (*Amphiprion percula*), así como Olsson y col. (1992) en cepas aisladas en rodaballo, y Chabrillón y col. (2005) con dos cepas aisladas del intestino de lenguado (*Solea senegalensis*), sugiriendo que el proceso de adhesión se debía a factores específicos como apéndices externos cubiertos por lectinas, o procesos no específicos donde intervienen factores físico-químico como interacciones electrostáticas y ácido lipoteicoico (Servin y Coconnier, 2003; Ringo y col., 2007). Por el contrario, Nikoskelainen y col. (2001a) encontraron que *Lactobacillus rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *Bacillus lactis* y *Enterococcus faecium*, evaluadas en su estudio, tenían mejor adherencia al polietileno que al mucus intestinal. Del mismo modo, Balcázar y col.

(2007), en su estudio, encontraron que diversas cepas del Género *Lactobacillus* se adhieren bien al polietileno, pero no describieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al mucus intestinal de trucha. Igualmente, Grzésekowiak y col. (2011) evaluando la adhesión de *Leuconostoc citreum* y *Enterococcus durans* encontraron una mejor fijación al polietileno que al mucus de carpa, trucha, y salmón pero sin que exista una correlación entre ambos, demostrando que en los procesos de adhesión intervienen procesos no específicos, pero solo parcialmente.

En el ensayo de exclusión competitiva, observamos que la adhesión del patógeno al mucus se ve disminuida de forma estadísticamente significativamente por las cuatro cepas probióticas con porcentajes de exclusión que varían entre el 42% al 58,3% para *Enterococcus gallinarum* L1 y *Enterococcus gallinarum* D1 con *V. anguillarum* y valores entre el 43% para *Enterococcus gallinarum* L1 y 57% para *Aerococcus viridans* D3S1 con *P. damsela* subsp *piscicida*, por lo que todas las cepas se manifiestan muy efectivas en la exclusión de los patógenos seleccionados a nivel intestinal, al igual que lo descrito por Vine y col. (2004), que observaron que la cepa AP5 disminuía significativamente la capacidad de adhesión de *Y. ruckeri* al mucus intestinal de trucha. El mismo efecto lo encontramos en el estudio realizado por Balcázar y col. (2007) quienes demostraron que diferentes cepas aisladas del intestino de trucha tenían la capacidad de reducir la adhesión de *Lactococcus garvieae*.

El análisis de exclusión competitiva es un criterio muy útil en la selección de cepas probióticas, ya que es un mecanismo que puede prevenir la colonización de ciertos patógenos, restringiendo su capacidad de fijación a tejidos receptores, bloqueando receptores análogos con adhesinas específicas (Gueimonde y col., 2006; Vine y col., 2006; Lazado y col., 2011). Aunque también pueden actuar simplemente mediante la producción de sustancias con efecto inhibitorio como han demostrado otros autores (Verschuere y col., 2000b; Chabrillón y col., 2006).

Por otra parte, en nuestros resultados no hemos encontrado correlación positiva entre las actividades de adhesión y la exclusión competitiva. Podemos observar que cepas con bajo nivel de adhesión como *Enterococcus gallinarum* D1, presentan altos valores de exclusión competitiva, y cepas como *Vagococcus fluvialis* L21, con altos porcentajes de adhesión muestran valores de exclusión menores. Estos datos coinciden con los

encontrados con otros autores que indican que en cada uno de estos mecanismos, tanto la adhesión y la exclusión competitiva, intervienen diferentes factores (Collado y col., 2007). Por esta razón, cada cepa bacteriana debe ser juzgada por sus propios méritos y no es posible la extrapolación absoluta de datos para descartar a una cepa como posible probiótica (Balcázar y col., 2007) atendiendo solo a estas características.

El mucus de los peces es rico en nutrientes y además presenta proteínas y carbohidratos que pueden utilizar las bacterias para su crecimiento. Las cuatro cepas probióticas seleccionadas son capaces de aumentar su concentración inicial, al menos en 1 logaritmo, tras 24 h de incubación utilizando el mucus intestinal de los peces como única fuente de nutrientes. Esta característica sugiere que las cepas, una vez administradas a los peces y en su transcurso por el tracto digestivo, podrían extenderse dentro del intestino y permanecer ahí hasta llegar a colonizarlo (Ringo y col., 2010). Nuevamente volvemos a resaltar en nuestro estudio los resultados obtenidos por la cepa *Vagococcus fluvialis* L21 que presenta los mayores valores de crecimiento en el mucus intestinal de la dorada y de la lubina (Tabla XXIV).

En la caracterización de una cepa como probiótica se encuentran otras actividades, como la sensibilidad/resistencia a los antibióticos. En los resultados a esta prueba, podemos observar que el perfil de las cuatro cepas es muy diferente, aunque todas comparten resistencia antibiótica frente a la kanamicina, trimetoprim, cefoxitina y cefalotina. La cepa *Enterococcus gallinarum* L1 presenta el mayor número de antibióticos a los que se muestra resistente, estando ampliamente documentado que diferentes especies de este género presentan diversos genes de resistencia a varios antibióticos, entre ellos la vancomicina y cefoxitina, y aunque en el ensayo utilizamos una concentración baja de vancomicina (5 µg), existen estudios donde se han descrito resistencias hasta la concentración de 16 µg/ml (Vincent y col., 1992). De manera general, nuestros resultados coinciden con otros estudios donde se señalan que las bacterias ácido lácticas son intrínsecamente resistentes a gran cantidad de antibióticos (Salminen y col., 1996).

Es conocido que la quimioterapia puede alterar la homeostasis de la fisiología intestinal y provocar que los peces sean más vulnerables a infecciones. En este sentido, la utilización de cepas probióticas resistentes a los antibióticos puede ser ventajoso en el caso de llegar a administrar antibióticos a los peces para controlar brotes de enfermedad,

estableciendo microorganismos beneficiosos en el intestino por tiempo prolongado (Kim y Austin, 2008).

La variabilidad de la química de los ácidos grasos presentes en las células bacterianas ha demostrado ser muy útil para la caracterización de las bacterias, y nuestras cepas presentan un perfil muy variado con concentraciones muy diversas. Por otra parte, sabemos que los ácidos grasos son cruciales para la salud nutricional, fisiológica y reproductiva de la mayoría de los vertebrados, entre ellos los peces. Además, es bien conocido que los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) con 20 o más átomos de carbono son componentes esenciales de la membrana celular de los tejidos de los peces, y pueden modular procesos inmunológicos y homeostáticos. La deficiencia de estos ácidos grasos en los peces se deriva en muchas enfermedades como lesiones degenerativas en las vísceras, erosión en las aletas y branquias, y mala adaptación a las bajas temperaturas (Agaba y col., 2005).

Desde el punto de vista nutricional es bien conocido que la actividad microbiana en el tracto digestivo puede ser una fuente de vitaminas, aminoácido y ácidos grasos. En nuestros resultados encontramos que la cepa *Enterococcus gallinarum* L1 presenta dos tipos de ácidos grasos esenciales, el araquidónico y el decosaheptaenoico en diferentes concentraciones, lo que nos sugiere que la presencia de este microorganismo en el intestino de los peces podría contribuir con los procesos nutricionales, como así lo sugirió Vine y col. (2006), afirmando que los lípidos producidos por microorganismos intestinales contribuyen significativamente en la dieta de algunos peces como rodaballo, tilapia, y trucha del ártico, modificando físicamente el tracto digestivo de estos animales.

Por otra parte, esta técnica de análisis de los lípidos presentes en las células bacterianas, también podría ser utilizada microbiológicamente para la separación de especies del mismo género o entre géneros diferentes muy cercanos taxonómicamente. En nuestro estudio pudimos diferenciar las dos cepas de *Enterococcus gallinarum* mediante sus perfiles de ácidos grasos, hecho ya utilizado anteriormente por Collins y col. (1987), quienes consideraron esta técnica como muy valiosa a la hora de diferenciar los Géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium*.

Siguiendo con la caracterización de las cepas seleccionadas, encontramos que las cepas probióticas en estudio presentaron un perfil enzimático muy variado. Aunque esta característica no ha sido un objetivo planteado en el presente estudio, dicha actividad enzimática se debería tener en cuenta, ya que se ha demostrado que la adición de bacterias a cultivos de peces, moluscos y crustáceos, podría ayudar al proceso digestivo, por producir enzimas extracelulares, como proteasas y lipasas, o proporcionando factores de crecimiento que ayuden a la mejor asimilación de los nutrientes por parte del animal (Askarian y col., 2011). Así, tenemos que las larvas de peces pueden utilizar enzimas exógenas para facilitar la digestión hasta que su sistema digestivo esté completamente diferenciado y desarrollado, dato que fue observado por Suzer y col. (2008), quienes describieron el aumento de la actividad enzimática en el intestino de larvas de dorada tras ser alimentadas con la cepa *Lactobacillus* spp. Por otra parte, Tovar y col. (2004) demostraron el aumento de la actividad enzimática en larvas de lubina tras adicionar levadura viva en el cultivo, sugiriendo que la microbiota del tracto gastrointestinal jugaba un importante papel en la nutrición de los animales.

Otras características que evaluamos en las cuatro cepas probióticas seleccionadas fueron algunos factores ligados a la virulencia, como la actividad hemolítica, debido a que la producción de hemolisinas es otro de los mecanismos relacionados con la virulencia de las cepas patógenas de humanos y animales (Minshew y col., 1978). En este ensayo observamos que las cuatro cepas producen hemólisis parcial en el medio agar sangre con eritrocitos de oveja, pero no hemos analizado los genes relacionados con esta característica y su relación con un aumento de su virulencia, como han sugerido otros autores (Wang y col., 2010). Pero en cualquier caso, la citotoxicidad que puedan producir las cepas probióticas por la hemolisina podría ser eliminada por el sistema inmune inespecífico de los peces (Wang y col., 2010), siendo éste un carácter que presentan habitualmente otros probióticos descritos.

Igualmente, ninguna de las cepas seleccionadas como posibles cepas probióticas en nuestro estudio presentó la capacidad de formar biofilm en superficies abióticas. La formación de biofilm en el Género *Enterococcus* ha sido recientemente reconocida como otro factor que contribuye a la virulencia de las cepas (Gómez y col., 2008). La capacidad de producir biofilm no parece restringirse a ningún grupo específico de microorganismos y en la actualidad se considera que, bajo condiciones ambientales adecuadas, la inmensa

mayoría de las bacterias, independientemente de la especie y superficie de adherencia, pueden producir biofilm, incluyendo los microorganismos patógenos (Donlan, 2002). Así, en humanos, muchas infecciones crónicas están relacionadas con cepas bacterianas formadoras de biofilm (Toledo-Arana y col., 2001) y en peces, se ha descrito que *Vibrio anguillarum* presenta una proteína que está relacionada con la formación de biofilm (Wang y col., 2003).

La hidrofobicidad de la superficie celular también es indicativa de algunos factores de virulencia. La virulencia de varias especies patógenas para peces como *Renibacterium salmoninarum* está fuertemente relacionada con la capacidad de adherencia de la superficie de esta célula a los tejidos (Toranzo y Barja, 1993). En nuestro estudio, únicamente la cepa *Vagococcus fluvialis* L21 presenta esta característica, y aunque para algunos investigadores la hidrofobicidad es considerada como factor de virulencia de algunos patógenos, otros relacionan este mecanismo como un requisito para la adherencia de microorganismos beneficiosos al tracto intestinal de los peces (Vázquez-Juárez y col., 1994). Del mismo modo, se han utilizado diferentes cepas del Género *Lactobacillus* con esta característica en la pared celular como probióticos en humanos (Vadillo-Rodríguez y col., 2005).

Por otra parte, es fundamental comprobar que la cepa preseleccionada, una vez adicionada en el pienso, resulta totalmente inocua para poderse considerar como una buena candidata a cepa probiótica, ya que su administración de forma regular, no debe producir daño alguno en los peces. Sin embargo, es un hecho que esta propiedad no se investiga rutinariamente por otros autores (Sharifuzzaman y Austin, 2009) cuando analizan las propiedades de una nueva cepa probiótica. En nuestro estudio hemos demostrado la inocuidad de las dos cepas utilizadas en los ensayos de protección, lo que nos permite continuar con la completa caracterización de las cepas y determinar el posible efecto protector frente a la vibriosis causada por *V. anguillarum*.

La microbiota intestinal de los peces es adquirida después de nacer, a través del alimento y del medio ambiente circundante, siendo diferente dependiendo de cada especie y de las condiciones en las que vive. Además, está continuamente cambiando durante su fase de crecimiento hasta llegar a su fase adulta, lo que significa que la constituyen diferentes grupos bacterianos, y éstos puede causar cambios en la microbiota intestinal con capacidad adhesiva en el tracto intestinal de los peces (Namba y col., 2007).

En vista de estas consideraciones, evaluamos la capacidad de colonización intestinal de las cepas seleccionadas en lubinas durante la fase de alimentación con la dieta experimental a la que adicionamos las cepas probióticas. Una buena cepa probiótica debe colonizar, multiplicarse y persistir en el hospedador, y en caso contrario debería ser suplementada regularmente en la dieta para mantener una buena concentración a nivel intestinal. En este segundo caso, la colonización no tiene un valor fundamental para la cepa propuesta.

En nuestro ensayo, que analizaba la capacidad de colonización, las cepas seleccionadas fueron administradas en el alimento durante 30 días, y pese a mostrar buenos resultados *in vitro* con respecto a la capacidad de adhesión al mucus intestinal de los peces, exclusión de patógenos y crecimiento en el mucus, en el ensayo *in vivo* no obtuvimos resultados totalmente satisfactorios, ya que transcurridas 48 horas de haber finalizado la alimentación con la dieta experimental, no fuimos capaces de detectar microbiológicamente las cepas probióticas adicionadas al pienso, hecho descrito anteriormente por Jöborn y col. (1997), en donde transcurridas 72 horas de la suspensión de la dieta con la cepa probiótica *Carnobacterium* sp. no se reaisló del contenido gastrointestinal. Por el contrario, *Carnobacterium* sp. se ha podido reaislar a partir del intestino de trucha hasta 14 días tras la suspensión de la alimentación con el probiótico (Kim y Austin, 2006), o del intestino del salmón hasta 6 días después (Robertson y col., 2000). Finalmente, Nikoskelainen y col. (2003) fueron capaces de reaislar *Lactobacillus rhamnosus* a partir del intestino de trucha arcoíris pasados 7 días tras la suspensión de la alimentación con la cepa probiótica adicionada en el pienso.

El epitelio intestinal y su secreción, el mucus, forman la primera barrera de defensa entre el pez y su ambiente. El mucus, además de la mucina, contiene otros componentes de secreción, compuestos por enzimas proteolíticas, aglutininas, proteína C-reactiva (CRP) y lisozima, las cuales inhiben e impiden la invasión bacteriana, lo que podría explicar que las cepas probióticas adicionadas en el pienso no fueran capaces de colonizar y mantenerse en el intestino de los peces, aunque otros factores también pueden influir en la colonización, como los movimientos peristálticos o la microbiota autóctona ya presente en los peces, que pueden producir compuestos inhibitorios (Finn, 1970; Fletcher, 1981; Ringo y col., 2007).

En nuestro caso, el hecho de haber reaislado las cepas probióticas adicionadas en el pienso únicamente hasta 2 días después de finalizar la alimentación del grupo de peces con la dieta experimental, sugiere que estas cepas fueron capaces de resistir el tránsito gastrointestinal, pero no de llegar a colonizar la mucosa intestinal, pudiendo deberse, simplemente, que a nivel intestinal se producen mecanismos protectores frente a elementos extraños como ya hemos mencionado anteriormente, o que las bacterias ya instauradas en el intestino impiden que otras se fijen mejor, como así lo describen Gildberg y col. (1995), Gildberg y Mikkelsen (1998). Asimismo, Günther y Jiménez-Montealegre (2004) mencionan que las bacterias utilizadas como probióticos en realidad sufren una exclusión competitiva en el tracto digestivo del hospedador, ya sea por los nutrientes o por el espacio.

A pesar de esto, se ha demostrado que bacterias que transitan por el tracto digestivo pueden ejercer efectos protectores sobre el hospedador al poseer alguna característica que les permita producir efectos beneficiosos sobre el mismo (Isolauri y col., 2001), por lo que algunos investigadores consideran que se hace necesario seguir administrándola con el alimento para garantizar su permanencia en el intestino y que pueda ejercer su acción protectora por cualquiera de sus posibles mecanismos de acción (Jöborn y col., 1997; Robertson y col., 2000; Nikoskelainen y col., 2003). En nuestro caso, podríamos realizar nuevos ensayos para determinar si aumentando el tiempo de administración de los probióticos, las cepas son capaces de colonizar el intestino de los peces, o incorporarlas al colectivo de peces en estadios larvarios, antes de que se haya establecido la microbiota dominante, y así poder colonizar el intestino de manera más efectiva.

La susceptibilidad de los peces a infecciones bacterianas es bien conocida y descrita en muchos trabajos de investigación, y puede variar en función de la especie, la edad y estado de los peces, la concentración del patógeno y del medio ambiente. La quimioterapia y la vacunación son los medios comúnmente utilizados para combatir este problema, y en la actualidad, a pesar de las limitaciones al uso de antibióticos, en acuicultura se siguen utilizando para combatir o prevenir enfermedades infecciosas (Karunasagar y col., 1994; Cabello, 2004). Pero el uso de probióticos en la industria acuícola supone mejorar la estrategia de manejo, y además es una herramienta sostenible con el medio, contribuyendo a combatir o prevenir los procesos infecciosos (Austin y col., 1995; Kesarcodi-Watson y col., 2008; Ringo y col., 2010). De esta forma, Gilbert y col. (1995) observaron los

efectos beneficiosos en cuanto a la supervivencia en larvas de salmón (*Salmo salar*) alimentadas con *Lactobacillus rhamnosus* tras una infección con *Aeromonas salmonicida*.

Raida y col. (2003) comprobaron como *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* reducían la mortalidad en trucha arcoíris frente a la enfermedad de la boca roja. Asimismo, Nikoskelainen y col. (2003) demostraron el efecto protector de *Lactobacillus rhamnosus* frente a una infección experimental con *Aeromonas salmonicida* en trucha arcoíris, y más tarde, Pirarat y col. (2006) comprobaron que esta misma cepa probiótica ofrecía protección a tilapias frente a una infección con *Edwardsiella tarda*. Por otra parte, Vendrell y col. (2007) evaluaron el efecto protector de dos bacterias ácido lácticas, *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 y *Lactobacillus plantarum* CLFP 238, mostrando mayor supervivencia en trucha arcoíris frente a la lactococosis, mientras que en mero (*Epinephelus coioides*) también se ha evaluado la cepa *Lactobacillus plantarum* frente a varias infecciones con Iridovirus y diversos *Streptococcus*, mostrando mejor crecimiento y mayor supervivencia aquellos peces alimentados con el probiótico (Sun y col., 2010).

En los primeros ensayos realizados, las cuatro cepas inhibieron el crecimiento de algunos patógenos y mostraron ciertas características como para poder recomendar su uso como probióticos en cultivo de peces. Pero para comprobar si *in vivo* producían algún efecto protector realizamos una experiencia de inoculación a pequeña escala. La infección se realizó por baño para tratar de reflejar lo que sucede de forma natural bajo condiciones normales de cultivo, ya que la vía de entrada de este patógeno es a través de las branquias, piel y/o intestino.

En el ensayo a pequeña escala realizado con lubinas, las cepas *Enterococcus gallinarum* L1 y *Vagococcus fluvialis* L21 ofrecieron unos resultados esperanzadores. Por el contrario, las cepas *Enterococcus gallinarum* D1 y *Aerococcus viridans* D3S1, a pesar de poseer excelentes cualidades como posibles cepas probióticas en los ensayos *in vitro*, no ofrecieron buenos resultados en el ensayo a escala realizada *in vivo*, quedando descartadas para el ensayo de desafío final. Parece obvio que en los criterios de selección de cepas probióticas se deben incluir pruebas *in vivo*, ya que como sabemos, buenos resultados *in vitro* no necesariamente significa que la cepa seleccionada vaya a trabajar del mismo modo en los peces. Como ejemplo de ello, varias cepas del Género *Carnobacterium* aisladas de trucha y bacalao *in vitro* mostraron excelentes propiedades como cepas probióticas frente

V. anguillarum, pero en el ensayo de inoculación no fueron capaces de proteger a los peces frente a una infección experimental con ese mismo patógeno (Ringo y col., 2010). Del mismo modo, no debemos generalizar a la hora de seleccionar una cepa como probiótica, ya que puede ocurrir que una cepa puede ofrecernos efectos beneficiosos para una especie determinada de peces y no para otras, ya que influye mucho la fase de crecimiento en la que se encuentran los animales (Gatesoupe, 2008), así como las condiciones del medio en el que se desenvuelven.

En la experiencia final para valorar el efecto protector de las cepas probióticas *Enterococcus gallinarum* L1 y *Vagococcus fluvialis* L21, fueron alimentadas lubinas de 18 gramos con cada una las cepas probióticas adicionadas al pienso durante 30 días y posteriormente fue inoculado el patógeno, registrándose una mortalidad del 17,33% para el grupo de peces alimentados con *Vagococcus fluvialis* L21, y del 24% en el grupo de lubinas en las que se adicionó *Enterococcus gallinarum* L1 en el pienso. Ambos tratamientos, fueron comparados con el 30% de mortalidad registrada en el grupo control (grupo de peces inoculados pero alimentados sin el probiótico), lo que representa un porcentaje relativo de supervivencia del 42,3% y 20%, respectivamente, respecto al grupo control.

En general, los peces infectados mostraron lesiones externas típicas de esta enfermedad como la septicemia hemorrágica, úlceras, descamación de la piel, palidez en las branquias, pero a nivel histológico no mostraron lesiones en los órganos internos, posiblemente debido a que los peces murieran de forma sobreaaguda debido al shock endotóxico producido por el patógeno, ya que, como sabemos, la virulencia de esta bacteria podría estar asociada al alto potencial citotóxico de los productos extracelulares que incluyen enzimas extracelulares, hemolisinas, hemaglutininas y toxinas termo-estables que podrían alterar el sistema de defensa del hospedador y ocasionar la muerte de los peces (Baffone y col., 2000), o debido al estado de estrés del hospedador que da lugar a una respuesta neuroendocrina, que incrementa los niveles de noradrenalina, induciendo la liberación de hierro, elemento importante para el patógeno (Leyton y Riquelme, 2008).

Existen muchos trabajos en los que se evalúa el efecto protector de diferentes cepas probióticas, evidenciándose una disminución en la mortalidad de los peces alimentados con las cepas probióticas. Así, tenemos que larvas de rodaballo alimentados con la cepa

Roseobacter 27-4 mostraron un 60%-70% de mortalidad frente a la infección con *V. anguillarum*, comparados con el 80%-90% de mortalidad en el grupo de peces control, lo que se traduce en un aumento en la protección entre el 22% y 25% (Planas y col., 2006). Asimismo, productos extracelulares de dos cepas probióticas *Kocuria* SM1 y *Rhodococcus* SM2, reducen la mortalidad entre 11- 17% en trucha arcoíris después de una infección con este patógeno (Sharifuzzaman y Austin 2010).

En otro estudio realizado en trucha, se evaluó el efecto protector frente a la forunculosis, utilizando dos cepas pertenecientes al grupo de bacterias ácido lácticas *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus lactis*, encontrándose porcentajes relativos de supervivencia del 76% y 59% respectivamente, tras la infección experimental (Balcázar y col., 2009).

En todo caso, las dos cepas utilizadas, en nuestro estudio en la prueba de protección frente a la infección por *V. anguillarum* producen un aumento en la supervivencia de los peces, cuando lo comparamos con lo que ocurre en el grupo control, pero únicamente este aumento es estadísticamente significativo cuando se adicionaba *Vagococcus fluvialis* L21. Esto se puede deber a que en algunos casos el tiempo de alimentación con el probiótico influye en la supervivencia de los peces tras la infección experimental. Así tenemos que, Sharifuzzaman y Austin (2009) demostraron que la alimentación de truchas durante dos semanas con la cepa probiótica *Kocuria* SM1 producía un efecto protector del 16%, mientras que después de cuatro semanas el porcentaje de supervivencia era mayor (22%) frente a una infección con *V. anguillarum*. A su vez, las cepas probióticas pueden ejercer su efecto protector frente a varias enfermedades infecciosas, y así, tilapias alimentadas con *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus acidophilus* durante dos meses presentaron mayores tasas de supervivencia frente a *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* y *Streptococcus iniae*, comparadas con los peces que solo recibieron el probiótico durante un mes (Aly y col., 2008).

Por otro lado, al no haberlo podido abordar en este estudio, desconocemos si se produce o no algún efecto protector “*in vivo*” de las cepas probióticas seleccionadas frente a la infección con otros patógenos, entre los que destacamos *P. damsela* subsp. *piscicida* o *Yersinia ruckeri* (Tabla XI, Figura 2 y Figura 3), después de haber comprobado una actividad destacada frente a ellos, *in vitro*, aun cuando esta última especie es un importante

patógeno de especies continentales. En general, a pesar de no haber obtenido valores tan elevados de supervivencia con la cepa *Enterococcus gallinarum* L1, en comparación con *Vagococcus fluvialis* L21, no deberíamos descartarla como posible cepa probiótica, ya que cada cepa debe ser juzgada por sus propios méritos y no descartarla sin antes someterla a otras pruebas (Balcázar y col., 2007). Es sabido que los probióticos son utilizados para producir diferentes beneficios en el hospedador, es decir, pueden actuar como fuente de nutrientes y contribución enzimática a la digestión, efecto antiviral, sobre el sistema inmune, sobre el crecimiento y malformaciones, o simplemente mejorando la tolerancia frente a situaciones de estrés (Ringo y col., 2010; Dimitroglou y col., 2011). Para ambas cepas evaluadas en nuestro estudio, probablemente ocurra lo mismo que lo descrito en otras investigaciones, ya que los mecanismos de acción de los probióticos, al ser de muy diversa naturaleza, pueden actuar al mismo tiempo solos o combinados, siendo muy difícil atribuir la protección a mecanismos independientes (Vásquez y col., 2005b).

V.2.- MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA DESCRIBIR UNA CARACTERÍSTICA DE UN PROBIÓTICO

Si bien, anteriormente hemos descrito los criterios para la selección de una cepa como probiótica, en algunas pruebas encontramos varios métodos alternativos para describir una misma característica. Actualmente, en el caso de la evaluación del efecto inhibitorio de los productos extracelulares, existen cuatro métodos comúnmente utilizados para la descripción de esta característica. En nuestro estudio, hemos utilizado simultáneamente tres de estas técnicas, de las cuales solo hemos obtenido resultados satisfactorios con el método de difusión en disco. Aunque todos los métodos parten de la misma base: “la bacteria produce sustancias extracelulares que inhiben el crecimiento de otras bacterias”, no siempre todos estos métodos son reproducibles, ya que como indican otros autores, intervienen diversos factores como la temperatura, las condiciones y medios de cultivo (Olsson y col., 1992). Estos resultados sugieren que, algunas veces, es necesario utilizar varios de estos métodos simultáneamente para comprobar una determinada característica, antes de considerar un resultado como desfavorable o no para un determinado criterio.

Continuando nuestra evaluación, encontramos que para el estudio de la capacidad de adhesión al mucus de los peces y la exclusión de patógenos a nivel intestinal, existen varios métodos basados en técnicas tradicionales como el recuento de células al

microscopio. Esta técnica resulta bastante engorrosa y laboriosa, y es susceptible de incrementar el error experimental. En su lugar, en nuestro estudio hemos evaluado dos métodos alternativos, que en principio resultan ser muy fiables (Grzésekowiak y col., 2011), como son la cuantificación mediante la radioactividad, donde las cepas son marcadas metabólicamente con timidina, y el método de la cuantificación por fluorescencia, donde las cepas se tiñen con Syto-9. En ambos casos, podemos evaluar tanto la adhesión como la exclusión competitiva de las cepas seleccionadas, pero como hemos podido observar en nuestros resultados, cada metodología presenta valores de adhesión muy distintos con valores medios entre 7,4%-12,1% para el método de radioactividad y para el método de fluorescencia valores medios entre 12,5%-27%. Además, en el primer método citado, encontramos diferencias significativas, mientras que en el segundo método, la cepa *E. gallinarum* D1, en el mucus de corvina y lenguado no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles, lo que hace necesario evaluar la eficiencia de cada uno de los métodos. Así encontramos que el método de cuantificación mediante radioactividad es mucho más laborioso y costoso económicamente. Además, presenta algunas desventajas a la hora de trabajar, pues conlleva unas medidas de seguridad mucho más exigentes para el investigador como por ejemplo, trabajar en un lugar específico y con materiales exclusivos para esta técnica, o que dichos materiales deben someterse a una estricta limpieza para evitar posible contaminación. Pero, sin duda, esta técnica es utilizada por muchos investigadores por considerarla, probablemente, mucho más exacta respecto de otras alternativas (Nikoskelainen y col., 2001a; Chabrilion y col., 2005; Balcázar y col., 2007; Grzésekowiak y col., 2011).

Por el contrario, el método de cuantificación mediante fluorescencia (Van der Marel y col., 2008) es mucho más sencillo de aplicar, más económico, más respetuoso con el medioambiente, y más seguro desde el punto de vista de la seguridad del investigador, al no requerir medidas especiales durante la manipulación de las muestras, pero sus valores no son constantes, al ser una medición que se realiza por excitación de la luz, lo que podría explicar que al hacer varias mediciones exista un mayor error experimental, o al menos, esto podemos concluirlo de nuestros resultados. La valoración de métodos para la adhesión y exclusión competitiva, aún no se ha realizado en ningún otro trabajo de investigación previo, por lo que nos parece importante realizar nuestra valoración en este apartado de nuestro trabajo.

V.3.- ESQUEMA DE VALORACIÓN DEL EFECTO DE UN PROBIÓTICO, O DE LAS SUSTANCIAS PRODUCIDAS POR EL MISMO

Como hemos mencionado a lo largo de este trabajo, está ampliamente documentado el uso de probióticos en acuicultura. Y es por eso que, hoy en día, su aplicación es aceptada como método de control frente a algunas enfermedades infecciosas. Existen algunos criterios para seleccionar cepas probióticas, donde se realiza el análisis de su posible mecanismo de acción y el efecto producido sobre el hospedador, pero dicha valoración se debería realizar en base a la función que va a producir la cepa probiótica seleccionada, y dependiendo también de la forma o vía para suministrarla: en el agua, en el alimento, administración de la cepa viva a los peces, inactivada (calor o rayos UVA), o simplemente si vamos a dar sus productos extracelulares ayudados por algún vehículo adecuado. Usualmente, se aíslan cepas con características probióticas del mismo hábitat donde van a ser utilizadas, como en nuestro trabajo, pero hay referencias donde se han utilizado cepas probióticas de humanos en peces frente a la forunculosis, por ejemplo (Nikoskelainen y col., 2001b).

En este trabajo, después de evaluar varios criterios para la selección de cepas probióticas como control biológico frente a la vibriosis, consideramos que algunas de estas características como el efecto inhibitorio, inocuidad, producción de sustancias antibacterianas, inocuidad, y protección frente a patógenos, son pruebas que pueden ser consideradas esenciales a realizar, dependiendo si la cepa seleccionada va ser ingerida viva por los peces, o si éstos solo van a ingerir sus productos extracelulares mezclados con el alimento, ya que, como mencionan otros autores, la presencia de alguno de estos productos en el intestino de los peces, puede actuar como una barrera protectora frente a la proliferación de patógenos oportunistas (Kesarodi-Watson y col., 2008; Ringo y col., 2010). Otras características de un probiótico como la adhesión, exclusión competitiva o la resistencia a pH, crecimiento en el mucus y colonización, podrían ser considerados como complementarias porque, a pesar de que la cepa seleccionada no cumpliera con estos requisitos, se podría mantener el efecto “probiótico”, suministrándola a los peces de forma continuada, como en el caso de algunos probióticos utilizados en humanos, aunque no sería lo más conveniente ni apropiado (Bezkorovainy, 2001). En la Figura 22 proponemos el conjunto de características, junto a los criterios de selección que deben ser tomados en cuenta, según la forma de administración de un probiótico para el control de enfermedades en acuicultura.

Figura 22.- Características que deben ser investigadas de un probiótico, según la forma de administración del mismo en los peces

