DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD DE LEÓN

PATOGENICIDAD, ADHESIÓN AL MOCO CUTÁNEO Y PODER INHIBITORIO FRENTE A *Saprolegnia parasitica* DE BACTERIAS REPRESENTATIVAS DE LA FLORA CUTÁNEA DE TRUCHA COMÚN (*Salmo trutta*) Y TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

Tesis Doctoral de
María Teresa Carbajal González
León, Mayo de 2013

UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

PATOGENICIDAD, ADHESIÓN AL MOCO CUTÁNEO Y PODER INHIBITORIO FRENTE A *SAPROLEGNIA PARASITICA* DE BACTERIAS REPRESENTATIVAS DE LA FLORA CUTÁNEA DE TRUCHA COMÚN (*SALMO TRUTTA*) Y TRUCHA ARCOÍRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Memoria presentada por la Licenciada en Veterinaria
Dña. **Maria Teresa Carbajal González** para optar al
Título de Doctora por la Universidad de León.

Directores de la Tesis Doctoral
Dr. José Miguel Aller Gancedo
Dr. Juan Miguel Fregeneda Grandes

León, mayo de 2013

A MIS PADRES

A FAUSTO

Agradecimientos

Quiero expresar mi enorme gratitud a todas las personas que han contribuido a que esta tesis haya sido posible y en especial:

A mis directores, Dr. José Miguel Aller Gancedo y Dr. Juan Miguel Fregeneda-Grandes, por brindarme la oportunidad de trabajar con ellos en este proyecto y por su confianza, paciencia y dedicación durante estos años.

Al Ministerio de Educación y al Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), por proveer la financiación necesaria para el desarrollo de las tareas de esta tesis (proyectos de investigación AGL2006-03374/ACU y AGL2009-10151).

A la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León y al Fondo Social Europeo, por dotarme de la beca predoctoral que me permitió realizar la Tesis.

Al Dr. Brian Austin, de la Heriot-Watt University (Edinburgh, UK) y al Dr. Dieter Steinhagen, de la Veterinary University of Hannover (Germany), y sus respectivos equipos de investigación, por tan amablemente abrirme las puertas de su laboratorio para desarrollar parte del trabajo experimental que recojo en esta memoria.

Al Dr. Alberto J. Villena Cortés, del Departamento de Biología Celular (Universidad de León) por prestarnos sus instalaciones para el desarrollo de experimentos con truchas vivas.

Al Servicio Territorial de Medio Ambiente de León (Junta de Castilla y León) por ayudarnos a recoger las truchas en los ríos de León y proporcionarnos trucha común del Centro Piscícola de Vegas del Condado (León) con paciencia y buen humor.

A la Piscifactoría Los Leoneses de Castrillo del Condado (León) por proporcionarnos las truchas arcoíris necesarias para algunos ensayos de la tesis.

A Dña. Gloria Fernández Bayón, Técnico del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de León, por la ayuda que me ha prestado todos estos años y por facilitarme enormemente el desarrollo del trabajo diario.

A mis compañeros del Departamento de Sanidad Animal, por los buenos y malos momentos que hemos compartido, la ayuda y apoyo que he recibido de ellos y esa grata sensación que proporciona pertenecer a un grupo con intereses comunes.

A mis amigos. De los que he conocido durante estos años de tesis destaco los buenísimos recuerdos que me han quedado de este largo camino y el apoyo y comprensión que he recibido de ellos. Y a los que tenía de antes, que me conocen y quieren, gracias por todo.

A mi familia y sobre todo a mis padres, siempre han estado a mi lado para brindarme el apoyo, amor y fuerza necesarios, aunque a veces no he confiado suficientemente en ellos mis penas y alegrías.

A Fausto, que ha sido más que un compañero, me ha ayudado, comprendido y sufrido. A él debo gran parte de esta tesis.

Índice

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS ..... **v**

RESUMEN **1**

SUMMARY **7**

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN **13**

CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS **21**

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES **25**

3.1. INTRODUCCIÓN 27

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS PARA *Saprolegnia* spp. 27

3.2.1. Medios de cultivo 27

3.2.1.1. Cultivos en cañamón 27

3.2.1.2. Cultivos en agar glucosa-peptona (agar GP) 28

3.2.2. Aislamiento e identificación de *Saprolegnia parasitica* 28

3.2.3. Conservación de *Saprolegnia parasitica* 29

3.3. MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS 30

3.3.1. Medios de cultivo 30

3.3.2. Conservación de las bacterias 30

3.3.3. Curvas de crecimiento 30

3.3.4. Recuentos bacterianos 31

3.3.4.1. Recuentos en cámara 31

3.3.4.2. Medición de la densidad óptica 32

3.3.4.3. Recuentos en placa 32

CAPÍTULO 4. FLORA BACTERIANA CUTÁNEA DE TRUCHA COMÚN Y TRUCHA ARCOÍRIS Y SU RELACIÓN CON LA SAPROLEGNIOSIS **33**

4.1. INTRODUCCIÓN 35

4.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 35

4.3. MATERIAL Y MÉTODOS 38

4.3.1. Peces y lugares de muestreo 38

4.3.2. Toma de muestras cutáneas y aislamiento de bacterias..... 40

4.3.3. Identificación de las bacterias con pruebas tradicionales..... 42

4.3.4. Identificación de las bacterias con pruebas moleculares 42

4.3.5. Números de acceso a las secuencias de nucleótidos 44

4.3.6. Aislamiento e identificación de *Saprolegnia parasitica*..... 44

4.3.7. Análisis estadístico 44

4.4. RESULTADOS 45

4.4.1. Datos cuantitativos de la flora bacteriana cutánea 45

4.4.2. Datos cualitativos de la flora bacteriana cutánea 46

4.4.3. Identificación de los aislados de *Saprolegnia*..... 54

4.5. DISCUSIÓN 54

CAPÍTULO 5. ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LAS BACTERIAS CUTÁNEAS FRENTE A *Saprolegnia parasitica* IN VITRO..... **59**

5.1. INTRODUCCIÓN 61

5.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... 61

5.3. MATERIAL Y MÉTODOS 65

5.3.1. Pruebas de inhibición con bacterias..... 65

5.3.1.1. Aislados bacterianos y de *Saprolegnia*..... 65

5.3.1.2. Inhibición del crecimiento del micelio en medio sólido..... 70

5.3.1.3. Inhibición del crecimiento del micelio en medio líquido con cañamón 70

5.3.1.4. Inhibición de la germinación de los quistes..... 71

5.3.2. Acción fungicida de las bacterias inhibitorias 72

5.3.3. Pruebas de inhibición con los sobrenadantes de los cultivos bacterianos 73

5.3.3.1. Preparación de los sobrenadantes 73

5.3.3.2. Inhibición del crecimiento del micelio en medio líquido con cañamón 74

5.3.3.3. Inhibición de la germinación de los quistes..... 74

5.4. RESULTADOS 74

5.4.1. Pruebas de inhibición con bacterias..... 74

5.4.1.1. Inhibición del crecimiento del micelio en medio sólido..... 74

5.4.1.2. Inhibición del crecimiento del micelio en medio líquido con cañamón 76

5.4.1.3. Inhibición de la germinación de los quistes..... 77

5.4.2. Acción fungicida de las bacterias inhibitorias 78

5.4.3. Aislados bacterianos más inhibitorios 79

5.4.4. Pruebas de inhibición con los sobrenadantes de los cultivos bacterianos 79

5.4.4.1. Inhibición del crecimiento del micelio en medio líquido con cañamón 79

5.4.4.2. Inhibición de la germinación de los quistes..... 79

5.5. DISCUSIÓN 83

CAPÍTULO 6. PATOGENICIDAD PARA LA TRUCHA ARCOÍRIS DE LAS BACTERIAS INHIBITORIAS DE *Saprolegnia parasitica* **87**

6.1. INTRODUCCIÓN 89

6.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... 89

6.3. MATERIAL Y MÉTODOS 90

6.3.1. Peces y tanques..... 90

6.3.2. Aislados bacterianos y preparación de los inóculos 91

6.3.3. Inoculación de los peces y seguimiento de la infección 91

6.4. RESULTADOS 92

6.5. DISCUSIÓN 94

CAPÍTULO 7. ADHESIÓN DE LAS BACTERIAS AL MOCO CUTÁNEO DE TRUCHA COMÚN Y ANTAGONISMO FRENTE A LA ADHESIÓN DE *Saprolegnia parasitica* **97**

7.1. INTRODUCCIÓN 99

7.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 99

7.3. MATERIAL Y MÉTODOS 100

7.3.1. Aislados bacterianos y de *Saprolegnia parasitica* 100

7.3.2. Obtención del moco cutáneo 101

7.3.3. Adhesión del moco cutáneo a la placa de poliestireno 102

7.3.4. Adhesión de las bacterias y de los quistes de *Saprolegnia parasitica* al moco cutáneo de trucha 103

7.3.4.1. Tinción de las bacterias y de los quistes de *S. parasitica* 103

7.3.4.2. Pruebas de adhesión al moco 104

7.3.5. Antagonismo de las bacterias frente a la adhesión de los quistes de *Saprolegnia parasitica* al moco cutáneo de trucha 105

7.3.5.1. Preparación de los quistes y de las bacterias 105

7.3.5.2. Pruebas de exclusión, competición y desplazamiento 105

7.3.6. Análisis estadístico 107

7.4. RESULTADOS 107

7.4.1. Adhesión del moco cutáneo de trucha a las placas de poliestireno 107

7.4.2. Adhesión de las bacterias al moco cutáneo 108

7.4.3. Adhesión de los quistes de *Saprolegnia parasitica* al moco cutáneo de trucha 110

7.4.4. Pruebas de exclusión, competición y desplazamiento de *Saprolegnia parasitica* con bacterias 110

7.5. DISCUSIÓN 113

CONCLUSIONES **117**

ANEXO 1. RELACIÓN DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS **123**

ANEXO 2. RELACIÓN DE CUADROS **127**

ANEXO 3. RELACIÓN DE FIGURAS **129**

ANEXO 4. RELACIÓN DE TRABAJOS DE LA TESIS DOCTORAL PUBLICADOS EN REVISTAS JCR **133**

4.1. Carbajal González, M.T., Fregeneda Grandes, J.M., Suárez Ramos, S., Rodríguez Cadenas, F. y Aller Gancedo, J.M. (2011). Bacterial skin flora variation and *in vitro* inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* in brown trout and rainbow trout. *Dis Aquat Org, 96:* 125-135.

4.2. Carbajal González, M.T., Fregeneda Grandes, J.M., González Palacios, C. y Aller Gancedo, J.M. (2013). Adhesion to brown trout skin mucus, antagonism against cyst adhesion and pathogenicity to rainbow trout of some inhibitory bacteria against *Saprolegnia parasitica*. *Dis Aquat Org, 104:* 35-44

BIBLIOGRAFÍA **157**

Resumen

La saprolegniosis produce pérdidas económicas importantes en el sector de la acuicultura continental de salmónidos y afecta también a las poblaciones naturales. Los tratamientos que se utilizan pueden presentar algunos inconvenientes, siendo uno de ellos el riesgo de efectos adversos sobre los peces o el medio ambiente, por lo que se planteó el presente trabajo de tesis doctoral con el fin de obtener bacterias que puedan llegar a utilizarse en la lucha biológica frente a la saprolegniosis.

Se efectuó un estudio cualitativo y cuantitativo de la flora bacteriana cutánea de la trucha común (*Salmo trutta* L.) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) y de su relación con algunos factores ambientales. Se utilizó trucha común sana y con saprolegniosis, procedente de dos ríos y de un centro reproductor de la provincia de León, obtenida en las cuatro estaciones del año; también trucha arcoíris sana, de tres piscifactorías de la provincia, recogida en invierno. Las muestras, que se obtuvieron por raspado de la piel y de las lesiones cutáneas, se cultivaron durante 7 d a 20 ºC en agar triptona soja y agar sangre calculándose las UFC cm^{-2}. Las bacterias de las colonias más representativas se identificaron mediante pruebas fenotípicas tradicionales y pruebas moleculares. La media de los recuentos bacterianos de la piel de trucha común sana fue unas 1000 veces inferior a la obtenida de las lesiones de saprolegniosis, pero fue similar a la de piel sana de trucha común enferma. *Iodobacter* sp. y *Deefgea rivuli* fueron las especies más aisladas de la piel sana de trucha común, mientras que *Iodobacter* sp. y *Aeromonas sobria* predominaron en las lesiones de saprolegniosis. En la trucha arcoíris fueron más frecuentes *Chryseobacterium*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas*, cada una de ellas en una piscifactoría diferente. Se encontraron diferencias cuantitativas y cualitativas en la flora de la trucha común sana dependiendo de la estación del año y punto de muestreo, confirmándose la importancia del medio ambiente en la composición de la flora cutánea. También se sugiere un posible papel protector de la flora bacteriana cutánea frente a la saprolegniosis con base en los resultados obtenidos.

Se realizaron pruebas de inhibición in vitro frente a *Saprolegnia parasitica* con 72 bacterias representativas de la flora cutánea. Se efectuaron ensayos en placas de Petri con agar infusión cerebro-corazón, en medio líquido con

cañamones colonizados por *S. parasitica* utilizando placas de cultivo celular de 24 pocillos y en estas mismas placas pero utilizando zoosporas de *S. parasitica*. Con las bacterias más inhibitorias se determinó también su efecto fungicida y se estudió si los sobrenadantes eran capaces de inhibir a *S. parasitica*. De los 72 aislados bacterianos probados, 24 produjeron alta inhibición de *S. parasitica* en los tres tipos de ensayos con células bacterianas. Estos aislados se identificaron como *Aeromonas piscicola* (1)*, Aeromonas popoffii* (2)*, Aeromonas salmonicida* (2), *Aeromonas sobria* (7), *Pantoea agglomerans* (3)*, Pseudomonas fluorescens* (5)*, Xanthomonas retroflexus* (1), *Serratia fonticola* (1) y *Yersinia kristensenii* (2), y muchos de ellos procedían de lesiones de saprolegniosis. Quince de estos aislados fueron fungicidas para *S. parasitica*, y los sobrenadantes de 19 aislados inhibieron su crecimiento lo que sugiere la producción una sustancia inhibitoria extracelular.

Los 24 aislados bacterianos que produjeron mayor inhibición in vitro de *Saprolegnia parasitica* se inocularon en trucha arcoíris para comprobar su inocuidad, característica imprescindible para poder ser utilizados en la lucha biológica frente a la saprolegniosis. Lotes de 10 truchas se inocularon con 10^6 células de la bacteria, la mitad de los peces por vía intramuscular y la otra mitad por vía intraperitoneal. Dieciséis de los aislados bacterianos, identificados como *Aeromonas piscicola* (1), *Aeromonas sobria* (3), *Pantoea agglomerans* (3), *Pseudomonas fluorescens* (5), *Serratia fonticola* (1), *Xanthomonas retroflexus* (1) y *Yersinia kristensenii* (2), fueron apatógenos. Estos aislados, excepto el de *A. piscicola* que fue patógeno en un estudio posterior, fueron seleccionados para realizar los ensayos restantes.

El moco cutáneo es la primera barrera que debe atravesar *Saprolegnia parasitica* para infectar al pez, por lo que las bacterias capaces de reducir la adhesión de *S. parasitica* al moco podrían ser útiles en la lucha biológica frente a la saprolegniosis. Por este motivo se realizaron pruebas in vitro para comprobar, tanto el grado de adhesión al moco cutáneo de trucha común de las 15 bacterias inhibitorias que fueron apatógenas, como la capacidad de éstas para reducir la adhesión de los quistes de *S. parasitica* bajo condiciones de exclusión, competición y desplazamiento. La adhesión de las bacterias al moco cutáneo fue en general baja. Un aislado de *Pseudomonas fluorescens*

fue el que se adhirió en mayor porcentaje (15,3%). La adhesión de las bacterias al moco de trucha común macho fue superior al observado en el moco de trucha hembra, pero similar a la unión a otros sustratos. También hubo correlación entre la adhesión al moco de macho y al poliestireno. Estos resultados sugieren que la unión de las bacterias a los sustratos se realiza de forma inespecífica y que están implicadas interacciones hidrofóbicas.

Los quistes de *Saprolegnia parasitica* se adhirieron en un elevado porcentaje al moco de trucha común macho (88,9%). Casi todos los aislados bacterianos consiguieron reducir significativamente este porcentaje bajo condiciones de exclusión y competición, necesitándose diferentes concentraciones de bacterias para este efecto. Sin embargo, sólo la mitad de los aislados bacterianos lograron desplazar a los quistes del moco siendo necesarias las concentraciones más elevadas de bacterias.

Algunos de los aislados bacterianos obtenidos podrían ser de utilidad en la lucha biológica contra la saprolegniosis, lo que deberá confirmarse con pruebas in vivo.

Summary

Saprolegniosis causes severe economic impact in continental salmonid fish farms and decline of wild populations. The control of saprolegniosis, based mainly on chemical products, has several disadvantages like the potential risk for animals and the environment. Therefore, the present thesis was held to begin the study of bacterial isolates which could be used in the biological control of saprolegniosis in a future.

The aerobic skin flora of wild and cultured brown trout (*Salmo trutta* L.) from two rivers and a fish farm in the province of León (NW Spain) was analysed quantitatively and qualitatively along the four seasons of a year in healthy and *Saprolegnia* infected fish, to get some information about its relationship with environmental factors. The skin flora of healthy rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) from three commercial fish farms was also studied. Skin samples were taken by scraping and after seven days at 20 ºC on tryptose soya agar and blood agar they were analyzed for total plate counts. Bacteria of the most representative colonies were purified for their identification by traditional and molecular methods. The mean of bacterial counts on skin of healthy brown trout was about 1000 times lower than on saprolegniosis lesions, but it was not different from that obtained on healthy skin of infected fish and healthy rainbow trout. *Iodobacter* sp. and *Deefgea rivuli* were the most isolated species from healthy skin of brown trout, whereas on lesions of saprolegniosis predominated *Iodobacter* sp. and *Aeromonas sobria*. In rainbow trout skin samples the main bacteria were those belonging to *Chryseobacterium*, *Staphylococcus* and *Pseudomonas*, each one in a different fish farm. There were also quantitative and qualitative differences between the bacterial skin flora of healthy brown trout of the different seasons and points. All these data confirm the influence of environment on the skin flora and it is suggested the existence of a protective flora against *Saprolegnia parasitica* on the skin of trout.

The in vitro inhibitory activity of 72 representative bacterial isolates from the skin flora of trout against *Saprolegnia parasitica* was tested. Assays were performed on Petri dishes with brain-heart infussion agar, in 24-well plates with a hemp seed colonised by *S. parasitica* and in the same plates but with zoospores of *Saprolegnia parasitica*. The fungicidal effect of the inhibitoriest

isolates was additionally tested, as well as the ability of their supernatants to inhibit *S. parasitica* in vitro. Twenty-four bacterial isolates belonging to species *Aeromonas piscicola* (1)*, Aeromonas popoffii* (2)*, Aeromonas salmonicida* (2), *Aeromonas sobria* (7), *Pantoea agglomerans* (3)*, Pseudomonas fluorescens* (5)*, Xanthomonas retroflexus* (1), *Serratia fonticola* (1) and *Yersinia kristensenii* (2)*,* were the inhibitoriest in the tests with bacterial cells, and most of them had been obtained from skin lesions of trout with saprolegniosis*. Fifteen* of these isolates were also fungicidal and the supernatants of 19 isolates were able to inhibit *S. parasitica* in vitro, so these bacteria might produce an extracellular inhibitory substance.

The bacteria intended to be used in the biological control of a disease must be innocuous to the host. Thus, we tested the pathogenicity to rainbow trout of the 24 bacterial isolates with a high in vitro inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica*. Groups of 10 fish were injected with 10^6 cells of each bacterial isolate, intramuscullarly in a half of the trout and intraperitoneally in the others. Sixteen of the isolates, identified as *Aeromonas piscicola* (1), *Aeromonas sobria* (3), *Pantoea agglomerans* (3), *Pseudomonas fluorescens* (5), *Serratia fonticola* (1), *Xanthomonas retroflexus* (1) and *Yersinia kristensenii* (2) were non-pathogenic. These isolates (except *A. piscicola*, which was found to be pathogenic in a later study) were selected for further study.

The capacity of the inhibitory and non pathogenic bacterial isolates to adhere to the skin mucus of brown trout and to reduce the adhesion of *Saprolegnia parasitica* cysts under exclusion, competition and displacement conditions was tested. This is a desirable characteristic of the bacteria to be used in the biological control of saprolegniosis, as mucus is the first barrier the *Oomycete* has to overcome to infect fish. The 15 bacterial isolates tested showed a low adhesion rate, not higher 15.3%, achieved by a *Pseudomonas fluorescens* isolate*.* Adhesion of bacteria was greater in the case of mucus from male brown trout than mucus from females. Similarities in the adhesion to male mucus and other substrates and correlation to that observed to polystyrene suggest that adhesion to skin mucus is not specific and that there are hydrophobic interactions.

A high percentage (88.9%) of the *S. parasitica* cysts adhered to the skin mucus of male brown trout. Almost all the bacteria reduced this adhesion ratio significantly under exclusion and competition conditions. However, only half of the isolates displaced cysts from skin mucus and the highest numbers of bacterial cells were necessary for this effect.

All these studies have provided potentially useful bacteria for the biological control of saprolegniosis. This will be assessed with in vivo assays.

Capítulo 1

Introducción

La saprolegniosis es una enfermedad de los peces de agua dulce que afecta tanto a las poblaciones naturales como a los peces de cultivo. Es frecuente en los salmónidos continentales, principalmente en los meses del otoño-invierno en torno a la freza, y en los reproductores y huevos de las piscifactorías, lo que ocasiona pérdidas económicas importantes.

La saprolegniosis se incluye dentro de las infecciones tegumentarias. El crecimiento del agente patógeno tiene lugar en la epidermis y la dermis, pudiendo en algunos casos alcanzar la musculatura superficial; en los peces pequeños llega a invadir los órganos internos. Los peces enfermos se reconocen fácilmente por la presencia de lesiones cutáneas de color blanquecino y aspecto algodonoso.

El control de la enfermedad puede ser complicado. Los tratamientos por medio de compuestos químicos presentan diversos inconvenientes, y los métodos preventivos y de control zootécnico no siempre son eficaces. Por todo ello, se planteó la presente tesis doctoral con la pretensión de iniciar el desarrollo de un método alternativo de lucha basado en el control biológico de *Saprolegnia parasitica*.

Las primeras descripciones de infecciones en los peces producidas por *Oomycetes* (a los que pertenece el género *Saprolegnia*) datan del siglo XVIII. Con el rápido desarrollo de la acuicultura en Europa y Norteamérica a finales del siglo XIX y principios del XX, se señaló la amenaza que constituían los *Oomycetes* para una gran variedad de peces de agua dulce (Neish y Hughes, 1980).

En España no se prestó atención a esta enfermedad hasta que se produjo una epizootia de saprolegniosis que afectó gravemente a las poblaciones de trucha común (*Salmo trutta*) de los principales ríos de la provincia de León y zonas limítrofes, en la década de los años 80 (Aller Gancedo y Fernández Díez, 1984 y 1987).

Las especies del género *Saprolegnia* tienen un ciclo biológico con reproducción asexual y sexual. En la reproducción asexual se forman zoosporangios que dan lugar a las zoosporas primarias, las cuales se

enquistan (quistes primarios) y a su vez originan las zoosporas secundarias; éstas se enquistan nuevamente (quistes secundarios) y son capaces de nadar más tiempo, por lo que se consideran la principal forma de dispersión e infección de *Saprolegnia* spp. (Hatai y Hoshiai, 1994; Andersson y Cerenius, 2002). En cuanto a la reproducción sexual, tiene lugar mediante la producción de gametangios masculinos (anteridios) y femeninos (oogonios). La fecundación de los oogonios se produce por la entrada del contenido de la célula anteridial dando origen a las oosporas que finalmente germinarán.

Durante años el género *Saprolegnia* se encuadró taxonómicamente dentro del reino *Fungi,* pero actualmente se incluye en el reino *Chromista.* Según el Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi (Kirk y col., 2008) pertenece a la familia *Saprolegniaceae*, orden *Saprolegniales*, clase *Oomycetes*, filo *Oomycota* y reino *Chromista*. La principal especie patógena del género es *Saprolegnia parasitica*, que ha recibido diversas denominaciones debido a que muchos de los aislados obtenidos de peces enfermos no producen estructuras sexuales en el laboratorio; clásicamente se han utilizado estas estructuras para identificar las distintas especies del género *Saprolegnia*.

Las técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa han ayudado a clarificar la taxonomía del género. Diéguez-Uribeondo y col. (2007) estudiaron la relación filogenética de las especies del complejo *Saprolegnia diclina-Saprolegnia parasitica* y la posición taxonómica de las cepas asexuales patógenas, llegando a la conclusión de que los aislados de *Saprolegnia* patógenos para los peces, especialmente los procedentes de salmónidos, constituyen un taxón claramente separado del resto de las especies consideradas saprofitas. Estos autores sugieren que se utilice el nombre de *Saprolegnia parasitica* para referirse a todos los aislados patógenos.

La saprolegniosis puede afectar a los peces de agua dulce en todas las fases de su ciclo biológico, incluidos los huevos. Los peces marinos no la padecen porque la salinidad del agua impide la supervivencia de *Saprolegnia* spp.; no obstante se han encontrado infecciones por *Saprolegnia* en peces de aguas de baja salinidad en estuarios (Stuart y Fuller, 1968; Noga y Dykstra,

1986). La saprolegniosis se ha descrito en diversas especies de salmónidos y en otros peces continentales, además de cangrejos de río (Diéguez-Uribeondo y col., 1994) y anfibios (Kieseker y col., 2001; Fernández-Benéitez y col., 2008). La enfermedad presenta una distribución mundial (Wood y Willoughby, 1986) y es diagnosticada con frecuencia en los países de la mitad norte del Hemisferio Boreal, que es el hábitat natural de los salmónidos. Es de presentación frecuente en áreas donde la cría de los salmónidos está ampliamente desarrollada, como Europa, Norteamérica y Japón (Aller Gancedo, 1988ª). Tiene un impacto económico importante en los salmónidos de cultivo, y también un alto impacto ecológico produciendo el declive de las poblaciones naturales de peces de agua dulce (van West, 2006; Bruno y col., 2010).

En la actualidad se considera que la forma infectante es la zoospora o el quiste secundario germinado o sin germinar (Phillips y col., 2008; Bruno y col., 2010). La vía principal de contagio es la cutánea, pero se ha señalado la posibilidad de que los propágulos de *Saprolegnia* lleguen al torrente circulatorio a través de las branquias (Gieseker y col., 2006). En individuos juveniles también se ha descrito el contagio por vía digestiva (Neish y Hughes, 1980). En las piscifactorías, durante la incubación de los huevos, las zoosporas colonizan primero los que están muertos y a partir de éstos las hifas invaden los huevos vivos de alrededor (Smith y col., 1985; Thoen y col., 2011).

Diversos factores predisponen a la infección, entre los cuales destacan los traumatismos (Rand y Munden, 1993; Fregeneda-Grandes y col., 2001), la maduración sexual (Aller Gancedo y Fernández Díez, 1987; Cross y Willoughby, 1989), el estrés (Neish y Hughes, 1980; Pickering, 1994) y la presencia de otras enfermedades (Pickering y Willoughby, 1982; Bruno y Wood, 1999). A su vez no existe evidencia de que las especies patógenas de *Saprolegnia* sean capaces de producir toxinas (Kales y col., 2007), aunque sí segregan sustancias con actividad proteolítica y lipolítica que podrían estar relacionadas con el proceso de avance de las hifas (Pickering y Willoughby, 1982; Smith y col., 1994). El resultado de la infección es la destrucción de la epidermis y la dermis, lo que da lugar a una grave alteración del mecanismo de osmorregulación, que finalmente provoca la muerte del pez por un proceso de hemodilución (Richards y Pickering, 1979).

Se considera que el principal mecanismo defensivo del pez lo desempeñan el tegumento y el moco cutáneo, formando una barrera física que impide la entrada de los agentes patógenos (Pickering y Willoughby, 1982; Cross y Willoughby, 1989). Existen evidencias de que hay una respuesta inflamatoria frente a la infección, habiéndose demostrado la presencia de células inflamatorias rodeando a las hifas de *Saprolegnia* sp. en peces infectados y en cultivos celulares (Wood y col., 1988; Álvarez, 1992; López-Dóriga, 1995; de Bruijn y col., 2012). También se ha demostrado la sobreexpresión de genes que codifican para diversas sustancias relacionadas con la respuesta inmunitaria, como citoquinas, proteínas de fase aguda o del complemento y péptidos antimicrobianos (Roberge y col., 2007; de Bruijn y col., 2012). Los datos sobre la respuesta inmunitaria humoral específica son contradictorios, aunque algunos estudios han demostrado la producción de anticuerpos específicos frente a *Saprolegnia* sp. patógena en varias especies de peces (Hodkinson y Hunter, 1970; Fregeneda-Grandes y col. 2007 y 2009).

El diagnóstico clínico es relativamente fácil por la observación de las lesiones cutáneas. Para confirmar el diagnóstico hay que comprobar en el laboratorio que el agente patógeno pertenece al género *Saprolegnia,* que no se trata de un hongo o seudohongo saprofito que colonizó los tejidos del pez post mórtem y que se trata de una infección primaria, no secundaria, a otros procesos infecciosos o parasitarios (Aller Gancedo, 1988[b]). Una pequeña porción del micelio de la lesión cutánea, depositado en una placa de Petri con agua destilada estéril a 10 ºC durante 48 h, permite visualizar la morfología de los zoosporangios y, mediante microscopía de contraste de fases del fondo de la placa, detectar los quistes secundarios con los filamentos largos y germinación indirecta característicos de *Saprolegnia parasitica* (Willoughby, 1985). El aislamiento de *Saprolegnia* spp. puede realizarse en agar harina de maíz, agar glucosa-peptona y en agua destilada o de río con semillas de cáñamo.

La formalina, cloruro sódico, permanganato potásico, peróxido de hidrógeno, ácido acético, sulfato de cobre y bronopol, son los productos más utilizados en el tratamiento de la enfermedad. No existen vacunas, y en la

prevención es muy importante evitar todos los factores que predisponen a la aparición de la enfermedad.

La presente memoria de tesis doctoral consta de un capítulo en el que se describen los objetivos, otro sobre los materiales y métodos comunes empleados en los diferentes experimentos, y cuatro capítulos específicos dedicados a caracterizar la flora bacteriana cutánea de la trucha y a estudiar su posible utilidad en el control biológico de la saprolegniosis, cada uno de los cuales incluye su respectiva revisión bibliográfica, material y métodos, resultados y discusión.

Capítulo 2

Planteamiento y objetivos

La saprolegniosis es una enfermedad frecuente en los salmónidos salvajes y en los de cultivo en España y otros países. No hay estudios en los que se compare la flora bacteriana cutánea de los peces sanos con la de los enfermos. El conocimiento de esta flora es interesante por su posible implicación en el desarrollo de la saprolegniosis, así como por la utilidad que pudieran tener las bacterias que la componen en el control de la infección por *Saprolegnia parasitica*.

Los distintos compuestos utilizados para el tratamiento de la saprolegniosis tienen, en mayor o menor grado, ciertos inconvenientes. Algunos autores han descrito que determinadas bacterias aisladas de la piel de peces o del agua tienen acción inhibitoria frente a *Saprolegnia* spp. Se ha sugerido la posible utilidad de estas bacterias anti-*Saprolegnia* o de sus productos en la lucha biológica frente a la saprolegniosis, lo que evitaría o reduciría el uso de productos químicos, cuya mala utilización en piscifactorías puede tener repercusiones en el piscicultor, el consumidor y el medio ambiente.

Para que la aplicación de la lucha biológica sea una realidad se necesitan más estudios. Se desconoce cuales son las bacterias con acción anti-*Saprolegnia* que pudieran estar presentes en las truchas de nuestro área geográfica, así como su posible utilidad en la lucha frente a la saprolegniosis de los salmónidos.

La búsqueda de bacterias cutáneas con utilidad potencial para la lucha biológica se desarrolla en varias etapas, de las que citamos algunas de ellas. En primer lugar deberán aislarse las bacterias de la piel del pez. Se efectuarán pruebas in vitro para comprobar la capacidad inhibitoria de estas bacterias frente al agente patógeno, aunque éstas pruebas no predicen exactamente el efecto que tendrán las bacterias in vivo. Se comprobará que las bacterias no son patógenas para los peces. Se estudiarán otras propiedades de las bacterias que pueden ser indicativas de su actividad in vivo, como la capacidad de adherirse a la superficie cutánea del hospedador, que es donde actúa *Saprolegnia parasitica*, así como la capacidad de la bacteria para reducir la adhesión de este organismo. Finalmente deberá confirmarse la eficacia de las

bacterias mediante pruebas in vivo con peces sometidos a la infección experimental con *S. parasitica*.

Por todo lo dicho anteriormente, se planteó la realización del presente trabajo de tesis doctoral con los siguientes objetivos:

1. Aislamiento de las bacterias predominantes en la flora bacteriana cutánea de trucha común (de peces sanos y con saprolegniosis) y de trucha arcoíris, procedentes de ríos y piscifactorías de la provincia León.

2. Comprobación de la capacidad de las bacterias cutáneas de inhibir in vitro el crecimiento de *Saprolegnia parasitica*.

3. Confirmación de la ausencia de patogenicidad en trucha arcoíris de las bacterias que presenten una mayor capacidad inhibitoria de *Saprolegnia parasitica* in vitro.

4. Comprobación de la capacidad de adhesión in vitro al moco cutáneo de trucha de las bacterias con mayor actividad frente a *Saprolegnia parasitica*, así como su capacidad para impedir o dificultar la adhesión de *S. parasitica* al moco cutáneo.

Capítulo 3

Material y métodos generales

3.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describen los materiales y métodos que son comunes a toda la parte experimental de la tesis, y que hacen referencia a diferentes tipos de cultivo utilizados para *Saprolegnia* spp. y a las técnicas bacteriológicas. En los capítulos posteriores se describirán los materiales y métodos específicos de cada uno de ellos.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS PARA *Saprolegnia* spp.

3.2.1. Medios de cultivo

3.2.1.1. Cultivos en cañamón

Se utilizaron para la identificación de los aislados de *Saprolegnia*, la producción de zoosporas, las pruebas de inhibición de *Saprolegnia parasitica* y las pruebas de adhesión al moco cutáneo de trucha.

Las semillas de cáñamo (*Cannabis sativa*) se cortaron en dos mitades y se esterilizaron a 121 ºC durante 15 minutos, desechándose las que perdieron la testa. Para los estudios morfológicos y la producción de zoosporas y quistes, los cañamones estériles se depositaron sobre agar glucosa-peptona en placas de Petri en las que crecía el aislado de *Saprolegnia*. Los cañamones, tras ser colonizados, se trasplantaron a placas de Petri con 20 ml de agua de río previamente filtrada con papel común de laboratorio y esterilizada (agua RFE). Estos cultivos en medio líquido favorecen la producción de zoosporangios y oogonios, puesto que *Saprolegnia* spp. no desarrolla la totalidad de sus estructuras reproductoras cuando crece sobre la superficie del agar, mientras que puede completar con facilidad su ciclo biológico cuando crece sobre un soporte rico en nutrientes suspendidos en el agua (Willoughby, 1994).

3.2.1.2. Cultivos en agar glucosa-peptona (agar GP)

Se utilizaron para el aislamiento de *Saprolegnia parasitica* de las truchas, la colonización de los cañamones por *S. parasitica*, las pruebas de inhibición y la conservación de los aislados de *S. parasitica.*

La composición del agar GP es la siguiente: agar 20 g l^{-1}, glucosa 3 g l^{-1}, peptona 1 g l^{-1}, $MgSO_4$ 7 H_2O 0,128 g l^{-1}, KH_2PO_4 0,0136 g l^{-1}, Ca 8 mg l^{-1}, Fe 0,5 mg l^{-1}, Mn 0,5 mg l^{-1}, Cu 0,1 mg l^{-1} y Zn 0,1 mg l^{-1} (Willoughby, 1994). Para el aislamiento de *Saprolegnia parasitica* de las truchas enfermas se añadieron 0,2 mg ml^{-1} de cloranfenicol (Sigma) para dificultar el crecimiento de bacterias.

3.2.2. Aislamiento e identificación de *Saprolegnia parasitica*

Los aislados de *Saprolegnia* se obtuvieron a partir de truchas comunes (*Salmo trutta* L.) enfermas de saprolegniosis procedentes del Centro Piscícola de Vegas del Condado (Junta de Castilla y León). Tras su captura, las truchas eran introducidas individualmente en bolsas de plástico con agua del estanque a la que se inyectaba oxígeno utilizando una botella de 5 L y 200 bar de presión (SEO S.A.) dotada de un reductor caudalímetro (SEO, modelo Minibloc 56) para regular y medir el caudal. Este procedimiento aseguraba la llegada de las truchas vivas al laboratorio.

El aislamiento de *Saprolegnia* se realizó a partir de un mechón de micelio de una de las lesiones, que se lavó varias veces con agua destilada estéril para reducir la contaminación bacteriana y que se sembró en agar GP con cloranfenicol. Para la obtención de cultivos de *Saprolegnia* totalmente libres de bacterias se realizaron varios pases en agar GP con cloranfenicol.

La presencia de *Saprolegnia* en las lesiones se comprobó por medio de la observación microscópica de una preparación realizada con un mechón del micelio y lactofenol azul de algodón, lo que permite ver la morfología de las hifas y de los zoosporangios.

Para confirmar la presencia de *Saprolegnia parasitica* se utilizó el método descrito por Willoughby (1985). Con este fin se recogió un pequeño trozo de micelio de una de las lesiones, se lavó tres veces en agua destilada estéril y se depositó en una placa de Petri con 20 ml de agua RFE. Seguidamente se incubó a 10 ºC en una estufa refrigerada (Memmert ICP 600) durante 48 horas, tras lo cual se examinó el fondo de la placa para comprobar la existencia de quistes con filamentos largos y germinación indirecta, característicos de *S. parasitica*. Para ello se eliminó el agua de la placa, se colocaron varios

cubreobjetos sobre la fina película de agua que quedaba en el fondo y se examinó mediante microscopía de contraste de fases a 400 x con un microscopio Nikon Optiphot-2.

La identificación de la especie de *Saprolegnia* se basó en los criterios morfológicos clásicos (Seymour, 1970; Willoughby, 1978). Con este fin se prepararon cuatro placas de Petri con 20 ml de agua RFE y un cañamón colonizado por el aislado de *Saprolegnia*, incubándose dos placas a 20 ºC y las otras dos a 7 ºC, ya que algunos aislados de *Saprolegnia* sólo producen oogonios a temperaturas bajas (Willoughby, 1978, Diéguez-Uribeondo y col., 2007). Las placas fueron examinadas periódicamente con una lupa estereoscópica (Kiowa SD-2PL) para comprobar la presencia de oogonios. Si éstos se desarrollaban, se estudiaba su morfología al microscopio óptico. Las placas a 20 °C y 7 ºC se incubaron durante 3 y 8 semanas respectivamente. En los aislados que no desarrollaron oogonios se comprobó si reunían las características de *Saprolegnia parasitica*, básicamente la presencia de filamentos largos en los quistes secundarios y la capacidad para germinar de forma indirecta.

3.2.3. Conservación de *Saprolegnia parasitica*

Se utilizaron frascos de vidrio tipo McCartney de 28 ml de capacidad, cuello ancho y tapón de rosca, empleando como medio de cultivo 20 ml de agua destilada y una semilla de cáñamo, lo que permite la conservación de los aislados de *Saprolegnia* durante bastantes años (Aller Gancedo y col., 1999). Para la conservación a corto plazo y resiembras frecuentes también se usó agar GP en plano inclinado en estos frascos. En ambos casos la siembra se realizó con un inóculo de agar (3-5 mm de lado) recortado de la periferia de una colonia en crecimiento en una placa de agar GP. Los frascos se incubaron a 20 ºC hasta que el micelio de *Saprolegnia parasitica* invadía gran parte de la superficie del agar en los frascos con medio inclinado o hasta que ocupaba la mitad del volumen de los frascos con agua. A partir de este momento fueron mantenidos a temperatura de refrigeración (4-7 ºC).

3.3. MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS

3.3.1. Medios de cultivo

Para el aislamiento de bacterias de la piel de trucha común y trucha arcoíris se utilizaron como medios de cultivo agar soja triptona (TSA; Cultimed) y agar sangre (TSA con un 5% de sangre de cordero de Biomerieux), utilizando la metodología descrita en el apartado 4.3.2. Las resiembras posteriores se realizaron en placas de Petri con TSA mediante siembra por agotamiento para obtener colonias aisladas (fig. 3.1). En todos los casos los medios de cultivo se incubaron a 20 ºC durante 3 días.

Fig. 3.1. Siembra por agotamiento. Cultivo de *Pseudomonas* sp. en agar TSA, 3 días a 20 ºC.

3.3.2. Conservación de las bacterias

Las bacterias se conservaron en caldo soja triptona (TSB; Cultimed) con un 30% de glicerol, manteniéndose a −80 ºC. Para ello se inoculó una sola colonia en un frasco con 3 ml de TSB que se incubó toda la noche a 20 ºC. Después se centrifugó a 3000 × *g* durante 10 minutos y se eliminó el medio de cultivo. Las bacterias se resuspendieron en TSB al que se añadió un 30% de glicerol. Alícuotas de 1 ml de esta suspensión bacteriana se distribuyeron en crioviales de 2 ml (Sterilin) y se guardaron en cajas específicas para crioconservación (Nalgene®).

3.3.3. Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento se utilizaron para las pruebas de inhibición de las bacterias frente a *Saprolegnia parasitica*, con el objeto de que las suspensiones bacterianas estuviesen en su fase exponencial de crecimiento. Para ello se prepararon preinóculos de las bacterias en frascos con 3 ml de TSB y se dejaron incubar toda la noche a 20 ºC. Después, 500 µl de este caldo fueron inoculados en 25 ml de TSB y se incubaron en un agitador orbital innova® 44 (New Brunswick Scientific) a 20 ºC y 200 rpm. Se siguió la

evolución de la turbidez del cultivo a diferentes tiempos durante los días necesarios para cada especie bacteriana, midiendo la densidad óptica (D.O.) a 540 nm con un espectrofotómetro Synergy HT (BIO-TEK). La representación gráfica de la D.O. a lo largo del tiempo permitió construir la curva de crecimiento. Al mismo tiempo se confeccionó una recta patrón realizando recuentos, en una cámara de Neubauer (Albert Sass, Alemania), de suspensiones bacterianas con D.O. conocida. Con esta recta, se pudo calcular por extrapolación la concentración de bacterias que correspondían a los valores de D.O. obtenidos en las lecturas del espectrofotómetro.

3.3.4. Recuentos bacterianos

Para el cálculo del número de bacterias existentes en las suspensiones bacterianas se emplearon tres métodos.

3.3.4.1. Recuentos en cámara

Se utilizó en las pruebas de inhibición in vitro y de patogenicidad de las bacterias (capítulos 5 y 6) tanto para conocer el número de bacterias correspondiente a una densidad óptica determinada como para calcular directamente la concentración de bacterias. Para ello se utilizó una cámara de Neubauer (Albert Sass, Alemania) con un retículo de 0,00025 mm^3 (fig. 3.2). La concentración de bacterias se calculó mediante la media aritmética de los recuentos obtenidos de tres muestras distintas.

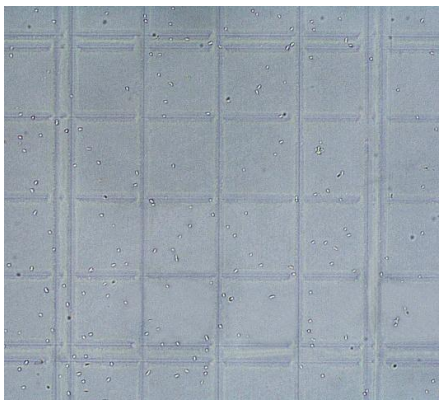


Fig. 3.2. Recuento en cámara de Neubauer: vista de un cuadrado grande con células de *Aeromonas* sp. (200 ×).

3.3.4.2. Medición de la densidad óptica

Se empleó en las pruebas de inhibición in vitro (capítulo 5), ya que debido a la elevada cantidad de aislados bacterianos que se iban a probar resultaba más rápido y práctico. Durante la realización de la curva de crecimiento se

habían efectuado recuentos en cámara que se correspondían con una determinada densidad óptica a 540 nm. Por tanto, midiendo esta densidad óptica en el momento de realizar las pruebas con la suspensión bacteriana, se pudo determinar la concentración de bacterias.

3.3.4.3. Recuentos en placa

Se utilizó en las pruebas de adhesión al moco cutáneo de trucha (capítulo 7), ya que debido al diseño del experimento se consideró lo más adecuado. Se realizaron diluciones seriadas 1/10 de la suspensión bacteriana en caldo TSB y se sembraron 100 µl de cada dilución en placas de Petri con agar TSA por duplicado, extendiendo la suspensión con una varilla de vidrio acodada (fig. 3.3). Las placas se incubaron el tiempo mínimo para que las colonias pudieran ser observadas (24 h a 25 ºC aproximadamente). Mediante el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) en cada dilución, que se multiplicó por el factor de dilución, se pudo conocer la cantidad de bacterias en la dilución inicial, que se conservó a 4 ºC hasta su utilización.

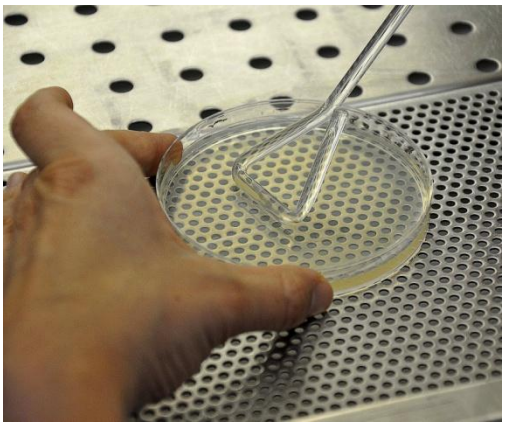


Fig. 3.3. Recuento en placa. Siembra en agar TSA para determinar el número de unidades formadoras de colonias.

Capítulo 4

Flora bacteriana cutánea de trucha común y trucha arcoíris y su relación con la saprolegniosis

4.1. INTRODUCCIÓN

La literatura científica sobre la flora bacteriana cutánea de diversas especies de peces es abundante, pero ningún trabajo investiga la relación de esta flora con la presencia de saprolegniosis. Consideramos que su estudio sería interesante en peces que padecen la enfermedad respecto a la búsqueda de bacterias con poder inhibitorio frente a *Saprolegnia parasitica*. En este sentido se planteó el estudio cuantitativo y cualitativo de las especies bacterianas que forman la flora cutánea de la trucha común (*Salmo trutta*), relacionando las variaciones en la flora con factores como la presencia o ausencia de la enfermedad, el hábitat de la trucha y la estación del año. Igualmente se planteó un estudio más reducido respecto a la flora bacteriana cutánea de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Los objetivos concretos del estudio fueron los siguientes:

1. Obtener información sobre la composición de la flora cutánea predominante en trucha común y trucha arcoíris, tanto de individuos sanos como enfermos de saprolegniosis.

2. Búsqueda de posibles relaciones entre la composición de la flora cutánea en trucha común y los factores relacionados con la saprolegniosis.

3. Obtención de bacterias de la flora cutánea con potencial efecto inhibitorio frente a *Saprolegnia parasitica.*

4.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las bacterias presentes en la piel de los peces afectados por *Saprolegnia parasitica* podrían tener importancia en el desarrollo de la enfermedad, incluso protegiéndolos de la infección (Petersen y col., 1994). Por tanto, el estudio de la flora cutánea de las zonas donde se asienta la infección podría proporcionar bacterias útiles en el control biológico de la enfermedad, como ya han realizado varios autores con respecto a otras enfermedades de peces y anfibios (Spanggaard y col., 2001; Hjelm y col., 2004; Silva y col., 2005; Harris y col.,

2006; Goldschmidt-Clermont y col., 2008; Aly y col., 2008; Fjellheim y col., 2010; Ran y col., 2012).

La población de los microorganismos presentes en la piel, branquias, intestino y ambiente de los peces, también ha sido analizada con la intención de estudiar los factores relacionados con el deterioro del pescado o la presencia de agentes patógenos (De León Fajardo y Marth, 1979; Abo-Elnaga, 1980; Olayemi y col., 1991; Acuff y col., 1984; González y col., 1999 y 2000; de Sousa y Silva-Souza, 2001). Algunos trabajos se han centrado en la influencia que puede tener el medio ambiente sobre la flora (Horsley, 1973; Nieto y col., 1984; Nedoluha y Westhoff, 1997; Diler y col., 2000; Izvekova y col., 2007) o en las variaciones estacionales de la misma motivadas principalmente por los cambios de temperatura (Georgala, 1958; Austin, 1983; Al-Harbi y Uddin, 2004). Otros estudios se han limitado a la búsqueda de grupos de microorganismos específicos (González y col., 2001). Algunos autores han relacionado la flora cutánea con una determinada enfermedad, como Nilsen y col. (2005) que estudiaron las variaciones en la flora del salmón y el bacalao en relación con con un síndrome que se caracteriza por la aparición de úlceras cutáneas durante el invierno y cuyo agente etiológico es *Moritella viscosa*.

La importancia de conocer el número y tipo de microorganismos presentes en la piel de los peces, en relación con su receptividad a la infección por *Saprolegnia parasitica*, ha sido señalada por Petersen y col. (1994). Sin embargo, hasta donde nosotros conocemos, sólo existe una comunicación a un congreso (Viljamma y col. 2005) en la que se vincula la presencia de la saprolegniosis con los microorganismos de la flora cutánea, de modo que en piscifactorías donde existía o había existido la enfermedad se aislaban con frecuencia bacterias del género *Iodobacter*.

En los estudios sobre la flora cutánea de peces se han empleado diversas técnicas de recogida de muestras, lo que hace difícil la comparación de unos con otros. Algunos autores utilizaron hisopos de algodón (Olayemi y col., 1991) o de alginato (Horsley, 1973; Nedoluha y Westhoff, 1997). Otros autores optaron por realizar una biopsia de un área determinada de piel, homogeneizándola bien manualmente en un mortero (Abo-Elnaga, 1980),

agitando las muestras con arena (Georgala, 1958) o mediante aparatos tipo Stomacher (Acuff y col., 1984) y Ultra Turrax (Spanggaard y col., 2001). González y col. (1999 y 2000) utilizaron un cilindro de metal raspando los 6,5 cm^2 de piel que éste delimitaba. Nilsen y col. (2005) optaron por frotar directamente la piel sobre una placa con agar. Incluso se han comparado diversos métodos de recogida de muestras, encontrándose diferencias importantes en los recuentos bacterianos obtenidos (Nedoluha y col., 2001).

El tiempo que transcurre entre la recogida de los peces y la obtención de la muestra es importante para obtener unos resultados fiables. La mayoría de autores transportan los peces al laboratorio una vez sacrificados. Los medios de cultivo utilizados y las condiciones de cultivo también varían de unos estudios a otros, dependiendo del tipo de microorganismos que se busque en cada uno de ellos. Así, la mayoría utilizan medios generales como el agar triptona o tripticasa soja (Acuff y col., 1984; Nieto y col., 1984; González y col., 1999; de Sousa y Silva-Souza, 2001), estos mismos medios con adición de NaCl (Al-Harbi y Uddin, 2004), “Plate Count Agar” con triptona, dextrosa y extracto de levadura (de León Fajardo y Marth, 1979; Nedoluha y Westhoff, 1997) o agar sangre (Nilsen y col., 2005). Los cultivos en anaerobiosis se utilizan con mayor frecuencia en los estudios de la flora intestinal que en la cutánea, ya que en la piel la flora esperada es aerobia (Horsley, 1973). También se emplean métodos de biología molecular, que no necesitan del cultivo de las bacterias, lo que posibilita la detección de las que no son cultivables y por tanto no pueden obtenerse por métodos tradicionales (Huber y col., 2004; Romero y Navarrete, 2006). De hecho, algunos autores han comparado los resultados obtenidos utilizando ambos métodos (Spanggaard y col., 2000; Pond y col., 2006; Hovda y col., 2007).

En cuanto al procedimiento para seleccionar las colonias bacterianas, previamente a su purificación e identificación con el fin de obtener la composición cualitativa de la flora, algunos autores han optado por hacerlo al azar, lo cual evita cualquier sesgo causado por la subjetividad (Georgala, 1958; Horsley, 1973; de León Fajardo y Marth, 1979; Nedoluha y Westhoff, 1997; González y col., 1999 y 2000). Otros, sin embargo, eligen las colonias más representativas según la morfología de las mismas (Acuff y col., 1984; Nieto y

col., 1984; Olayemi y col., 1991; de Sousa y Silva-Souza, 2001; Al Harbi y Uddin, 2005).

La identificación de las bacterias que componen la flora se ha realizado durante mucho tiempo con métodos tradicionales, como son la tinción Gram y pruebas bioquímicas (Georgala, 1958; Horsley, 1973; de León Fajardo y Marth, 1979; Nieto y col., 1984; Olayemi y col., 1991; González y col., 1999 y 2000; de Sousa y Silva-Souza, 2001; Al Harbi y Uddin, 2005). También se han utilizado galerías comerciales de identificación (de Sousa y Silva-Souza, 2001; Al Harbi y Uddin, 2005), pero éstas son poco adecuadas para identificar bacterias ambientales por tener un número limitado de especies en las bases de datos (Bosshard y col., 2006; Austin y Austin, 2007). Otro método que ha sido empleado son las pruebas comerciales basadas en la cromatografía gaseosa de ácidos grasos bacterianos (Nedoluha y Westhoff, 1997). Los estudios más recientes prefieren utilizar la secuenciación del gen 16S del ARN ribosómico (Spaangard y col., 2000; Jensen y col., 2002; Huber y col., 2004; Romero y Navarrete, 2006; Skrodenyte-Arbaciuskiene y col., 2006; Kim y col., 2007; Smith y col., 2007; Yang y col., 2007), que tiene la ventaja de ser más preciso en la identificación y menos ambiguo, en general, que las pruebas bioquímicas (Bosshard y col., 2006).

4.3. MATERIAL Y MÉTODOS

4.3.1. Peces y lugares de muestreo

Se recogió trucha común (*Salmo trutta*) en tres lugares de la provincia de León: a) río Porma, donde han existido brotes de saprolegniosis desde hace años; b) río Omaña, donde muy raramente se han encontrado truchas con esta enfermedad; y c) Centro Piscícola de Vegas del Condado (Junta de Castilla y León), que se abastece de agua del río Porma y donde suelen verse truchas infectadas por *Saprolegnia parasitica* (fig. 4.1). En cada lugar se recogieron entre 6 y 8 truchas adultas sanas (28,8 ± 7,4 cm, 329 ± 294 g), y con saprolegniosis cuando las había, con una periodicidad estacional, comenzando en abril del 2006 y finalizando en enero del 2007. Se intentó seleccionar el mismo número de machos que de hembras. La temperatura del agua en cada

punto de muestreo varió entre 6 ºC en invierno y 11,5 ºC en otoño en el río Porma, entre 4 ºC en invierno y 13 ºC en verano en el río Omaña y entre 6 ºC en invierno y 11 ºC en verano en el Centro Piscícola. El número total de truchas recogidas fue de 96 (78 sanas y 18 enfermas de saprolegniosis). Se realizó un muestreo adicional de 6 truchas comunes con saprolegniosis (28,1 ± 6,2 cm, 271,8 ± 197,7 g) en el Centro Piscícola de Vegas del Condado, en enero de 2008 (temperatura del agua 7 ºC), para disponer de un mayor número de muestras de piel sana de truchas con saprolegniosis.

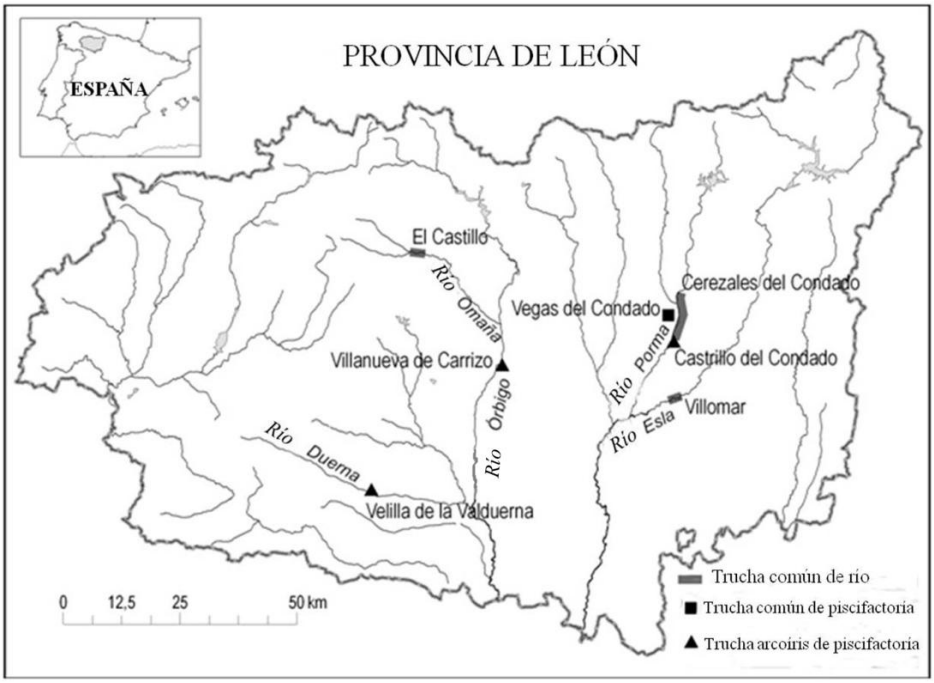


Fig. 4.1. Localización geográfica de los puntos de muestreo de trucha común en el río Omaña (El Castillo), río Porma (entre Cerezales y Castrillo del Condado) y Centro Piscícola (Vegas del Condado), y de trucha arcoíris de piscifactorías situadas en el río Duerna (Velilla de la Valduerna), río Órbigo (Villanueva de Carrizo) y río Porma (Castrillo del Condado).

También se recogió trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en tres piscifactorías comerciales de la provincia de León: a) Piscifactoría Villanueva, situada junto al río Órbigo en Villanueva de Carrizo; b) Piscifactoría Los Leoneses, situada junto al río Porma en Castrillo del Condado; y c) Piscifactoría Las Zayas, situada junto al río Duerna en Velilla de la Valduerna (fig. 4.1). En todos los casos fueron hembras adultas y sanas (30,6 ± 1,5 cm, 311 ± 55,6 g) que se recogieron entre diciembre de 2007 y enero de 2008 (temperatura del agua de 3,5 ºC, 4,5 ºC y 6 ºC en las piscifactorías del Órbigo, Porma y Duerna,

respectivamente). El número total de truchas arcoíris analizadas fue de 14 (4 de la piscifactoría del Órbigo, 4 de la del Porma y 6 de la del Duerna).

La captura de las truchas en los ríos se realizó con la colaboración del personal de la Sección de Vida Silvestre II (Pesca) de León, perteneciente al Servicio Territorial de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León, utilizando un equipo de pesca eléctrica propiedad de dicho Servicio Territorial. Tras su captura, las truchas eran introducidas individualmente en bolsas de plástico con agua de río a la que se inyectaba oxígeno. Este sistema de transporte aseguraba la llegada de las truchas vivas al laboratorio.

4.3.2. Toma de muestras cutáneas y aislamiento de bacterias

Una vez en el laboratorio, las truchas fueron sacrificadas mediante contusión en la cabeza siempre dentro de las dos horas siguientes a su captura. A continuación se lavó suavemente la superficie cutánea con agua destilada estéril tratando de reducir las bacterias contaminantes procedentes del ambiente. La muestra se recogió por encima de la línea lateral, entre la cabeza y la aleta dorsal, en las truchas sanas (fig. 4.2 a 4.4), y de una de las lesiones en las afectadas de saprolegniosis. Además, en las truchas con saprolegniosis recogidas en el Centro Piscícola en enero de 2007 y enero de 2008, se muestreó también una zona de piel sana. Para la obtención de la muestra se situó sobre la piel un sacabocados de 16 mm de diámetro, que delimitaba un área de 2 cm^2 que se sometió a un intenso raspado con una espátula metálica previa adición de 1 ml de PBS (8mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, 2,5 mM KCl y 138mM NaCl) como diluyente (fig. 4.2). La suspensión así formada se retiraba con una pipeta Pasteur (fig. 4.3), realizándose diluciones seriadas 1/5 para las muestras de piel sana y 1/10 para las de lesiones. Una alícuota de 100 µl de la suspensión inicial y de tres diluciones de las muestras de piel sana y de ocho de las de lesiones, se extendió en placas de Petri con agar TSA y con agar sangre. Las placas se incubaron a 20 ºC durante 7 días (fig. 4.5 a 4.7), tras los cuales se hicieron los recuentos de las unidades formadoras de colonias (UFC) preferentemente en las placas con 30-300 colonias, lo que no siempre fue posible debido al escaso crecimiento bacteriano de las muestras de piel sana. Las UFC/cm^2 se calcularon a partir del

número medio de colonias obtenido en los dos medios de cultivo empleados, ya que no hubo diferencias significativas entre ambos (ANOVA, P>0,05). Las colonias más abundantes se seleccionaron por su morfología, preferentemente de las placas con 30-300 colonias, resembrándose repetidamente en agar TSA hasta obtener cultivos puros. Estas bacterias se conservaron a −80 ºC en caldo TSB con un 30% de glicerol (v/v).

Fig. 4.2 a 4.4. Obtención de la muestra cutánea en una trucha arcoíris. **4.2**. Raspado de la superficie cutánea delimitada por un sacabocados de 16 mm de diámetro, tras haber añadido 1 ml de PBS. **4.3.** Recogida de la suspensión formada tras el raspado. **4.4**. Aspecto de la superficie cutánea después de obtener la muestra (flecha).

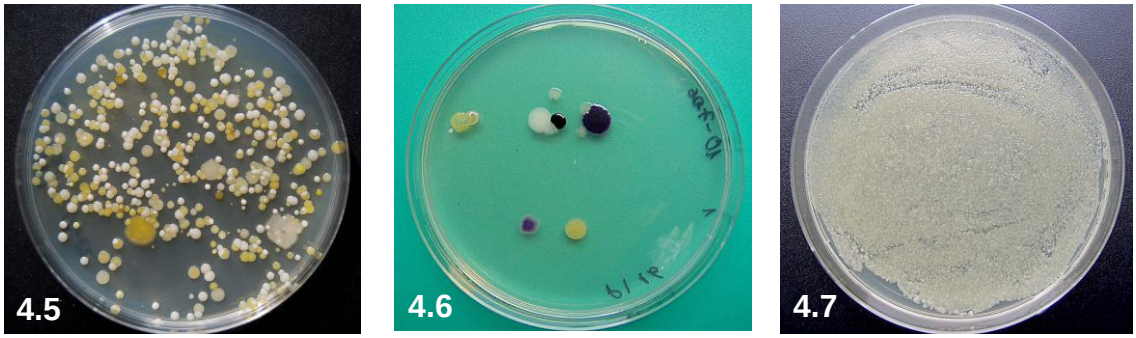


Fig. 4.5 a 4.7. Cultivos de raspados cutáneos de trucha en TSA a 20 ºC. **4.5.** Cultivo de 3 días de una trucha arcoíris sana. **4.6.** Cultivo de 7 días de una trucha común sana procedente de un estanque tratado con desinfectantes. **4.7.** Cultivo de 3 días de una lesión de saprolegniosis de una trucha común.

4.3.3. Identificación de las bacterias con pruebas tradicionales

La identificación de las bacterias con técnicas tradicionales se basó en las pruebas siguientes: morfología y pigmentación de la colonia; tinción de Gram y reacción con KOH al 3%; motilidad en caldo nutritivo (Scharlau); actividad catalasa en 3% (v/v) de agua oxigenada; actividad oxidasa (Pathotec® Cytochrome oxidase, Remel); hemólisis en agar sangre; metabolismo oxidativo o fermentativo (Bacto O/F basal medium [Difco] con 1% p/v de glucosa); crecimiento en agar McConkey (Difco); sensibilidad al agente vibriostático 0/129 (Oxoid) (para bacilos Gram-negativos y oxidasa positivos); y test Klieger (en tubos con 5 ml de medio Klieger y sólo para géneros de la familia *Enterobacteriae*). Además, con 50 bacterias Gram-negativas se utilizaron galerías comerciales de identificación API20 E y API20 NE (Biomerieux®), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, realizándose la interpretación de los resultados a las 48 horas de incubación utilizando el programa informático APILAB Plus versión 3.2.2.

4.3.4. Identificación de las bacterias con pruebas moleculares

Una colonia de cada aislado bacteriano puro fue inoculada en frascos con 3 ml de caldo TSB incubándose durante 24 h a temperatura de laboratorio. Tras centrifugar a 3000 × *g* durante 10 min el ADN de las bacterias se extrajo utilizando un kit de extracción (Qiagen, Crawley, UK), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para amplificar un fragmento del gen 16S rRNA se utilizaron los cebadores bacterianos universales 27F (5´-AGAGTTTGATC(A:C)TGGCTCAG-3´) y 1492R (5´-TACGG(C:T)TACCTTGTTACGACTT-3´) (Invitrogen). Para los aislados bacterianos identificados como *Pseudomonas* por el método tradicional, se utilizaron los cebadores fPs16S (5´-ACTGACACTGAGGTGCGAAAGCG-3´) y rPs23S (5´-ACCGTATGCGCTTCTTC ACTTGACC-3´) (Invitrogen) para la identificación de la especie, de modo que también se amplificó un fragmento del gen 23S rRNA (Locatelli y col., 2002). La mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa contenía 0,22 mM de cada desoxinucleotido trifosfato, 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 1× polymerase reaction buffer (Invitrogen),

1,65 mM $MgCl_2$, 12,5 pM de cada cebador y 10 µl de ADN (≈1 ng), en un volumen total de 60 µl. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando 3 min de desnaturalización inicial a 95 ºC, seguida por 35 ciclos de desnaturalización durante 1 min a 95 ºC, anillamiento durante 1 min a 56 ºC, y extensión durante 2 min a 72 ºC. Después se efectuó una extensión final durante 10 min a 72 ºC. En cada reacción de PCR se incluyeron testigos negativos reemplazando el ADN por agua destilada estéril. Los productos de la amplificación se analizaron en un gel de agarosa (Pronadisa) al 1% (p/v) en TBE (Tris-boric-EDTA, 0,089 M Tris, 0,089 M ácido bórico y 0,0025 M EDTA) con 100 ppm de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium), mediante electroforesis a 100 V durante 45 min utilizando una fuente EPS 200 (Pharmacia Biotech) y visualizándose las bandas obtenidas con ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta (UV Transilluminator 2000). Los productos de la PCR fueron purificados con un Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las reacciones de secuenciación fueron realizadas mediante un DYEnamic ET dye terminator kit (Amersham Biosciences) seguido por la carga de las muestras en un secuenciador automático MegaBace500 (Amersham Biosciences) con los cebadores 27F (5´-AGAGTTTGATC(A:C)TGGCTCAG-3´) y 685R3 (5´-TCTACGCATTTC ACCGCTAC-3´) (Invitrogen), para todas las bacterias excepto las pertenecientes al género *Pseudomonas,* para las que se utilizaron los cebadores fPs16S (5´-ACTGACACTGAGGTGCGAAAGCG-3´) y rPs23S (5´-ACCGTATGCGCTTCTTCA CTTGACC-3´) (Invitrogen). Los cromatogramas resultantes de las secuencias de ADN fueron examinados utilizando el programa informático Chromas Pro versión 2.13 y las secuencias directa e inversa se compararon y corrigieron utilizando el programa ContigExpress (Invitrogen). Después se cotejaron con secuencias conocidas contenidas en la base de datos del Genbank utilizando el algoritmo BLASTn en la página web del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). El límite fijado para dar por exitosa una identificación como especie fue una identidad ≥98%. Si esto no era posible se aceptaba la identificación del género cuando la identidad era ≥95%.

Con un aislado de *Aeromonas* sp. se identificó posteriormente la especie mediante la secuenciación parcial del gen *gyrB*, por necesidades del estudio.

4.3.5. Números de acceso a las secuencias de nucleótidos

Las secuencias representativas de cada especie fueron depositadas en la base de datos del EMBL (http://www.ebi.ac.uk/embl/Access/index.html) bajo los números de acceso FN908434 a FN908459.

4.3.6. Aislamiento e identificación de *Saprolegnia parasitica*

Se recogieron muestras del micelio de las lesiones de todas las truchas clínicamente enfermas de saprolegniosis para confirmar que el agente causal era *Saprolegnia parasitica*. Para ello se utilizaron las técnicas descritas en el apartado 3.2.2. Algunos de los aislados se guardaron en cepario tal como se describe en el apartado 3.2.3.

4.3.7. Análisis estadístico

Para determinar si las diferencias entre las medias o las medianas de los recuentos bacterianos (tras su transformación logarítmica) eran significativas ($P<0,05$) se utilizaron las pruebas estadísticas de Análisis de la Varianza (ANOVA) o Kruskal-Wallis (K-W) dependiendo del resultado de la prueba de Barlet de homogeneidad de las varianzas. Los cálculos estadísticos fueron realizados utilizando el programa informático Epi Info™ versión 3.2.2 (Center for Diseases Control and Prevention).

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Datos cuantitativos de la flora bacteriana cutánea

Las medias de los recuentos bacterianos por cm^2 de piel (UFC cm^{-2}) de cada tipo de muestra están representadas en las figuras 4.8 a 4.11.

4.4.1.1. Trucha común

En las truchas sanas los recuentos bacterianos estuvieron comprendidos entre 2×10^1 y $6,4 \times 10^3$ UFC cm^{-2} (media geométrica 57,28). En las truchas

con saprolegniosis los recuentos en la piel sana estuvieron entre $1,5 \times 10^1$ y $1,9 \times 10^3$ UFC cm^{-2} (179,14) y en las lesiones entre $4,2 \times 10^1$ y $1,6 \times 10^8$ UFC cm^{-2} (57 517,50). Existieron diferencias significativas entre los recuentos bacterianos de la piel sana y de las lesiones de saprolegniosis en las truchas enfermas (K-W, $P<0,001$), pero no entre los recuentos de piel sana de truchas con la enfermedad y sin ella (K-W, $P>0,05$) (fig. 4.8). Los recuentos bacterianos de la piel de los machos no fueron significativamente diferentes de los de las hembras (ANOVA, $P>0,05$) ni en las truchas sanas ni en las enfermas (no se muestran los datos). En la piel de trucha común sana los recuentos bacterianos variaron significativamente entre las distintas estaciones y puntos de muestreo (K-W, $P<0,001$ y ANOVA, $P=0,0029$ respectivamente), y las medias oscilaron entre 22,95 UFC cm^{-2} en otoño y 167,61 UFC cm^{-2} en primavera, y entre 21,77 UFC cm^{-2} en el centro piscícola y 90,14 UFC cm^{-2} en el río Omaña. Por el contrario, los recuentos bacterianos en las lesiones de saprolegniosis en cada estación o lugar de muestreo no fueron diferentes (ANOVA, $P>0,05$) (fig. 4.9 y 4.10).

4.4.1.2. Trucha arcoíris

Los recuentos bacterianos en la piel de trucha arcoíris sana oscilaron entre $0,2 \times 10^1$ y 2×10^3 UFC cm^{-2} (media geométrica 49,40) (fig. 4.11). Se encontraron diferencias significativas (ANOVA, $P<0,005$) entre los recuentos de cada una de las tres piscifactorías comerciales muestreadas, oscilando sus medias entre 12,25 UFC cm^{-2} en la piscifactoría ubicada en el río Porma y 833,5 UFC cm^{-2} en la piscifactoría del río Órbigo (fig. 4.11).

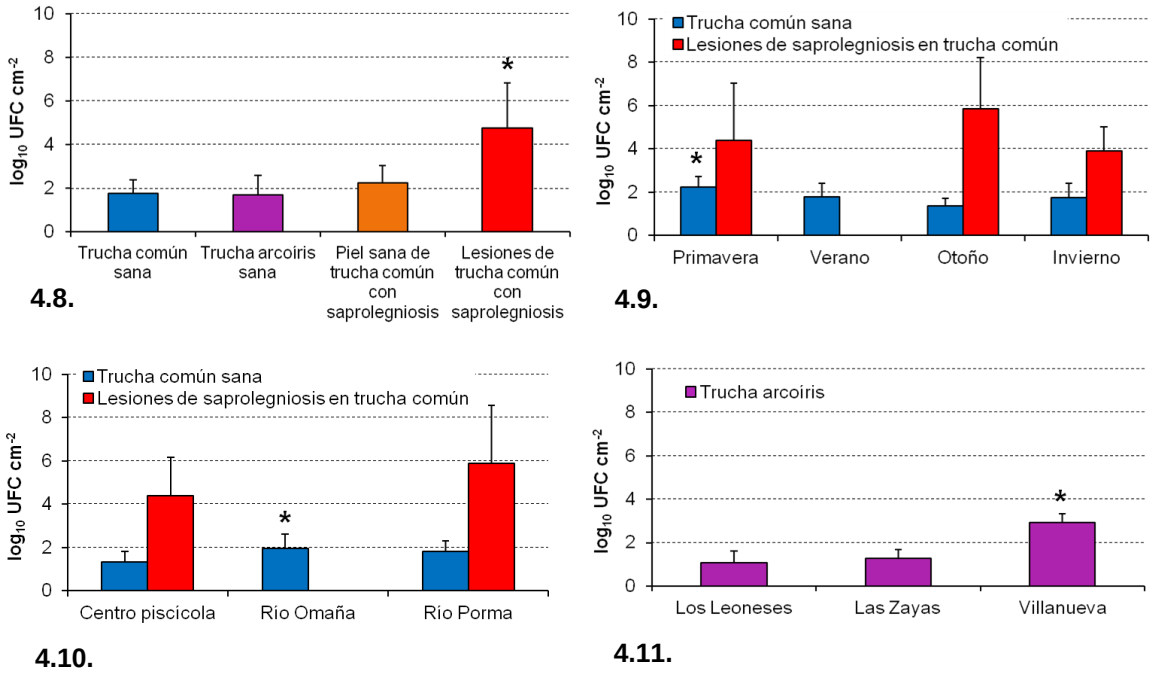


Fig. 4.8 a 4.11. Número de bacterias (media + DE) presentes en la piel de trucha común y de trucha arcoíris en relación con los factores siguientes: **4.8.** Especie y estado de la piel; **4.9.** Estación del año; **4.10.** Lugar de procedencia de la trucha común; **4.11.** Piscifactoría de la trucha arcoíris. No hubo truchas con saprolegniosis en verano y tampoco en el río Omaña. Las medias significativamente diferentes del resto están marcadas con un asterisco.

4.4.2. Datos cualitativos de la flora bacteriana cutánea

Se seleccionaron 137 bacterias para su identificación, 119 obtenidas de trucha común y 18 de trucha arcoíris.

De las 119 bacterias de trucha común, 61 procedían de truchas sanas y 58 de truchas con saprolegniosis (13 de piel sana y 45 de lesiones). De estas 119 bacterias en 61 se identificó correctamente el género con los métodos fenotípicos tradicionales. Respecto a las 50 bacterias Gram-negativas con las que se utilizaron las galerías API, en 15 se identificó correctamente la especie, en 16 el género y 19 no pudieron ser identificadas. Por el contrario las 119 bacterias fueron identificadas utilizando la secuenciación del gen 16S ARNr (y 23S en *Pseudomonas* spp.), en 71 la especie y en 48 el género. Además, por secuenciación parcial del gen *gyr B* una *Aeromonas* sp. se identificó como *Aeromonas piscicola*. Los resultados de las pruebas tradicionales, las galerías API y las pruebas moleculares fueron idénticos respecto a los géneros identificados. También hubo concordancia entre las galerías API y la

identificación molecular de la especie en todas las bacterias identificadas, excepto en dos, para las cuales se aceptó la identificación molecular por ser más fiable.

Respecto a las 18 bacterias de trucha arcoíris seleccionados para su identificación, 8 procedían de la piscifactoría del Órbigo, 4 de la del Porma y 6 de la del Duerna. En todas las bacterias se identificó el género mediante los métodos tradicionales y 9 de ellas también fueron identificadas mediante métodos moleculares (4 el género y 5 la especie), obteniéndose los mismos resultados con ambos métodos.

Las especies identificadas en los diferentes tipos de muestra cutánea de trucha común y trucha arcoíris están representadas en el cuadro 4.1. Las especies aisladas con mayor frecuencia de la piel de trucha común sana fueron *Iodobacter* sp., *Deefgea rivuli* y *Yersinia kristensenii* (todos los aislados de *Yersinia* se obtuvieron en verano). En la trucha común con saprolegniosis las especies predominantes en la piel sana fueron *Iodobacter* sp. y *Deefgea rivuli*, y en las lesiones *Iodobacter* sp., *Aeromonas sobria* y *Aeromonas* sp. Respecto a las principales especies aisladas de trucha arcoíris, en la piscifactoría del Órbigo fueron *Chryseobacterium* sp. y *Rhodococcus* sp., y el resto bacilos Gram-positivos no identificados; en la piscifactoría del Porma *Staphylococcus* sp., *Frigoribacterium* sp. y *Moraxella osloensis*; y en la piscifactoría del Duerna *Pseudomonas fluorescens* y *Staphylococcus* sp., clasificándose el resto como bacilos Gram-negativos no identificados.

Cuadro 4.1. Identificación taxonómica de 137 aislados bacterianos obtenidos de la piel de trucha común sana, trucha común con saprolegniosis y trucha arcoíris sana.

Bacteria	Trucha común sana	Trucha común con saprolegniosis		Trucha arcoíris sana	Total de aislados
		Piel sana	Lesiones		
Achromobacter xylosoxidans	2	0	0	0	2
Acinetobacter lwoffii	0	0	1	0	1
Acinetobacter sp.	1	0	1	0	2
Aeromonas piscicola	0	0	1	0	1
Aeromonas popoffii	0	0	3	0	3
Aeromonas salmonicida	0	0	3	0	3
Aeromonas sobria	2	1	10	0	13
Aeromonas sp.	0	1	6	0	7
Bacilo Gram-negativo	0	0	0	1	1
Bacilo Gram-positivo	0	0	0	1	1
Brevundimonas nasdae	1	0	0	0	1
Carnobacterium maltaromaticum	1	1	1	0	3
Chryseobacterium sp.	3	0	0	6	9
Deefgea rivuli	6	2	0	0	8
Flavobacterium succinicans	1	0	0	0	1
Flavobacterium sp.	1	1	1	0	3
Frigoribacterium sp.	0	0	0	1	1
Iodobacter fluviatilis	2	0	1	0	3
Iodobacter sp.	9	2	11	0	22
Janthinobacterium lividum	2	0	0	0	2
Jantinobacterium sp.	1	0	0	0	1
Kocuria rhizophila	2	0	0	0	2
Kurthia zopfii	0	0	1	0	1
Microbacterium foliorum	1	0	0	0	1
Microbacterium hydrocarbonoxydans	1	0	0	0	1
Microbacterium phyllosphaerae	1	0	0	0	1
Microbacterium sp.	1	0	0	0	1
Moraxella osloensis	0	0	0	1	1
Pantoea agglomerans	3	0	0	0	3
Plantibacter agrosticola	0	1	0	0	1
Pseudomonas fluorescens	1	1	4	4	10
Rhodococus fascians	1	0	0	0	1
Rhodococcus sp.	2	1	0	1	4
Serratia fonticola	2	0	0	0	2
Staphylococcus pasteuri	1	1	0	0	2
Staphylococcus sp.	3	1	1	3	8
Xanthomonas retroflexus	1	0	0	0	1
Yersinia enterocolitica	2	0	0	0	2
Yersinia intermedia	2	0	0	0	2
Yersinia kristensenii	5	0	0	0	5
Total	**61**	**13**	**45**	**18**	**137**

Las especies bacterianas aisladas con mayor frecuencia de la piel de trucha común sana en cada estación y punto de muestreo se indican en el cuadro 4.2. En primavera, *Yersinia enterocolitica, Iodobacter fluviatilis* y *Deefgea rivuli* fueron las especies más frecuentemente aisladas en las truchas de los ríos Porma y Omaña, además de *Rhodococcus* sp. pero sólo en este último río; en las truchas del Centro Piscícola no hubo crecimiento bacteriano en esta estación. En verano predominaron los aislamientos de *Iodobacter* sp. y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, con la mayoría de estos últimos procedentes del río Omaña. En otoño destacó *Staphylococcus* sp., sobre todo en las truchas del río Omaña, mientras que en el Centro Piscícola fue *Kocuria rhizopila*. En invierno predominó *Deefgea rivuli,* que se aisló de los ríos Porma y Omaña, seguida por *Iodobacter* sp.*, Chryseobacterium* sp. y *Janthinobacterium lividum.*

Cuadro 4.2. Número de aislados bacterianos de las especies más representativas obtenidas de la piel de trucha común sana en las diferentes estaciones y puntos de muestreo. Los cultivos de las muestras del Centro Piscícola fueron negativos en primavera.

Bacteria	Primavera			Verano			Otoño			Invierno		
	CP[1]	RO[2]	RP[3]	CP	RO	RP	CP	RO	RP	CP	RO	RP
Achromobacter xylosoxidans	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-
Acinetobacter sp.	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Aeromonas sobria	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-
Brevundimonas nasdae	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Carnobacterium maltaromaticum	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Chryseobacterium sp.	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1
Deefgea rivuli	-	1	1	-	-	-	-	1	-	-	2	1
Flavobacterium succinicans	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Flavobacterium sp.	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Iodobacter fluviatilis	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Iodobacter sp.	-	-	-	1	4	1	-	-	1	-	-	2
Janthinobacterium lividum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
Jantinobacterium sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Kocuria rhizophila	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
Microbacterium foliorum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Microbacterium hydrocarbonoxydans	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-

Cuadro 4.2. Continuación

Bacteria	Primavera			Verano			Otoño			Invierno		
	CP[1]	RO[2]	RP[3]	CP	RO	RP	CP	RO	RP	CP	RO	RP
Microbacterium phyllosphaerae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Microbacterium sp.	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Pantoea agglomerans	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas fluorescens	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Rhodococus fascians	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Rhodococcus sp.	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Serratia fonticola	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus pasteuri	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Staphylococcus sp.	-	-	-	-	-	-	-	2	1	-	-	-
Xanthomonas retroflexus	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Yersinia enterocolitica	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yersinia intermedia	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
Yersinia kristensenii	-	-	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-
Total	-	**4**	**3**	**4**	**15**	**9**	**3**	**4**	**2**	**2**	**4**	**11**

[1] CP: Centro Piscícola de Vegas del Condado

[2] RO: Río Omaña

[3] RP: Río Porma

Las especies bacterianas aisladas de lesiones de saprolegniosis en cada estación y punto de muestreo se muestran en el cuadro 4.3. En primavera sólo se dispuso de truchas con saprolegniosis procedentes del Centro Piscícola, donde las bacterias más frecuentemente aisladas fueron, en este orden, *Iodobacter* sp., *Aeromonas sobria* y *Aeromonas* sp. En verano no se encontraron truchas con saprolegniosis en ninguno de los puntos de muestreo. En otoño las especies más frecuentemente aisladas fueron *Aeromonas sobria* en el Centro Piscícola y *Aeromonas popoffii* en el río Porma. En invierno *Iodobacter* sp. fue la que más se aisló, sobre todo en el Centro Piscícola, seguida por *Pseudomonas fluorescens* también más en este punto. En el río Omaña no se encontraron truchas con saprolegniosis en ninguna de las cuatro estaciones.

Cuadro 4.3. Número de aislados bacterianos de las especies más representativas obtenidas de las lesiones de saprolegniosis en trucha común, en las diferentes estaciones y puntos de muestreo. No se encontraron truchas con saprolegniosis en verano, ni en ninguna de las cuatro estaciones en el río Omaña.

Bacteria	Primavera		Otoño		Invierno	
	CP[1]	RP[2]	CP	RP	CP	RP
Acinetobacter lwoffii	-	-	-	1	-	-
Acinetobacter sp.	-	-	-	1	-	-
Aeromonas piscicola	1	-	-	-	-	-
Aeromonas popoffii	-	-	-	3	-	-
Aeromonas salmonicida	1	-	-	1	-	1
Aeromonas sobria	2	-	4	1	1	2
Aeromonas sp.	1	-	1	1	3	-
Carnobacterium maltaromaticum	-	-	-	-	1	-
Flavobacterium sp.	-	-	-	-	1	-
Iodobacter fluviatilis	-	-	-	-	1	-
Iodobacter sp.	4	-	1	-	5	1
Kurthia zopfii	-	-	-	1	-	-
Pseudomonas fluorescens	-	-	-	-	3	1
Staphylococcus sp.	-	-	-	-	1	-
Total	**9**	**0**	**6**	**9**	**16**	**5**

[1] CP: Centro Piscícola de Vegas del Condado

[2] RP: Río Porma

4.4.3. Identificación de los aislados de *Saprolegnia*

Todos los aislados de *Saprolegnia* presentaban las características morfológicas propias de *Saprolegnia parasitica*, entre ellas los quistes secundarios con filamentos largos y el predominio de la germinación indirecta. Ninguno de estos aislados de *S. parasitica* desarrolló oogonios en los cultivos realizados a 7 y 20 ºC.

4.5. DISCUSIÓN

La comparación de los diversos estudios realizados sobre la flora cutánea es compleja, ya que el número de bacterias encontradas está influenciado por factores como el método empleado para obtener la muestra y la capacidad de las bacterias de crecer en el medio de cultivo utilizado (Horsley, 1973; Spanggaard y col., 2000; Nedoluha y col., 2001; Huber y col., 2004; Romero y Navarrete, 2006). Sin embargo, se ha citado que los recuentos bacterianos en la piel de los peces generalmente oscilan entre 10^2 y 10^4 bacterias cm^{-2} (Austin, 2006). En el presente trabajo, los recuentos de la flora bacteriana aerobia en la piel sana de trucha común y trucha arcoíris estuvieron por debajo de los encontrados por otros autores en diferentes especies de peces de agua dulce, comprendidos entre 10^2 y 10^5 UFC cm^{-2} (Horsley, 1973; Abo-Elnaga, 1980; Acuff y col., 1984; Nedoluha y Westhoff, 1997; Diler y col., 2000), e incluso por debajo de los recuentos obtenidos por González y col. (1999) en trucha común salvaje y trucha arcoíris de piscifactoría utilizando una técnica similar para la obtención de la muestra cutánea. La discrepancia con este autor puede deberse a diferencias con su técnica de muestreo (raspado de 6,5 cm^2 y uso de agua de peptona como diluyente), a que transportaban las truchas muertas al laboratorio dentro de las 6 horas siguientes a su recogida (en nuestro caso se trasladaron vivas y se procesaron antes de 2 horas) y al medio de cultivo utilizado.

Se encontró una alta variabilidad individual en los recuentos bacterianos, coincidiendo con lo observado por Spanggaard y col. (2000) y Huber y col. (2004), pero estos autores en el intestino de trucha arcoíris. En las lesiones de saprolegniosis los recuentos bacterianos, como era previsible, fueron mucho

mayores que los obtenidos en la piel sana (diferencias estadísticamente significativas). También se encontraron diferencias en los recuentos a lo largo de las estaciones del año en la piel de trucha común sana, pero no en las lesiones de saprolegniosis. Varios autores han descrito variaciones estacionales en los recuentos bacterianos principalmente relacionados con la temperatura del agua, siendo generalmente la flora más abundante con temperatura alta (Georgala, 1958; Austin, 1983; Al-Harbi y Uddin, 2004). En el presente trabajo los recuentos más altos se obtuvieron en primavera, a pesar de que la temperatura del agua no era la más alta, aunque otros factores ambientales pueden haber intervenido en este hecho. Los recuentos más bajos en otoño, estación en la que suelen aparecer las primeras truchas con saprolegniosis, junto a los recuentos mayores en el río Omaña en el que no se han encontrado truchas afectadas de esta enfermedad, lleva a pensar en la posibilidad de que pudiera existir una flora cutánea autóctona protectora frente a las infecciones por *Saprolegnia parasitica*. A este respecto, Nilsen y col. (2005) encontraron que el crecimiento bacteriano era más escaso en la piel sana de poblaciones de peces que posteriormente desarrollaban "úlcera de invierno" (enfermedad asociada con la bacteria *Moritella viscosa*) que en la piel de poblaciones que no la padecían.

En las piscifactorías suelen utilizarse desinfectantes para controlar diversos agentes patógenos, pero estas sustancias pueden tener efectos adversos sobre la flora bacteriana cutánea. Esto podría explicar los recuentos más bajos observados en truchas comunes del Centro Piscícola, donde los tratamientos eran habituales, y también los recuentos más altos en trucha arcoíris de la piscifactoría del Órbigo, donde no se utilizaban tratamientos químicos. Además, la ausencia de crecimiento de bacterias en primavera a partir de la trucha común del Centro Piscícola probablemente fue causada por un tratamiento con formalina que había sido efectuado 24 horas antes de la recogida de las truchas.

Existieron diferencias notables entre las bacterias aisladas con mayor frecuencia en la piel de trucha común sana y las procedentes de las lesiones de saprolegniosis. La menor variedad de especies en las lesiones podría ser

debido a la proliferación de bacterias de crecimiento más rápido y mayor capacidad invasiva. El género *Iodobacter* fue uno de los más frecuentemente obtenidos de la piel de trucha común, con una ligera mayor abundancia en piel sana que en lesiones de saprolegniosis. Sin embargo, el aislamiento de este género ha sido relacionado con la presencia de infecciones por *Saprolegnia* (Viljamaa y col., 2005). La razón de esta diferencia puede ser que estos autores utilizaron un medio específico (low nutrient agar) para aislar este género, por lo que crecería mejor al evitar la proliferación de otras bacterias. *Deffgea* sp., género filogenéticamente muy cercano a *Iodobacter*, fue también encontrado con frecuencia en el presente trabajo en la piel sana de trucha común, junto con el género *Yersinia*, aunque este último sólo se aisló en verano. Los géneros citados por otros autores como los más frecuentes en la flora cutánea de las mismas especies de peces de agua dulce (truchas común y arcoíris) fueron *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Micrococcus* y Coryneformes (González y col., 1999). En nuestro caso el género *Aeromonas* se aisló la mayoría de las veces de lesiones de saprolegniosis y frecuentemente en la piel sana de trucha común con la enfermedad, pero escasamente en la piel de peces sanos. El género *Pseudomonas* fue hallado también en una proporción más alta en la trucha común con saprolegniosis, además de en trucha arcoíris sana. Otro dato llamativo es la presencia de este género preferentemente en invierno, tanto en la piel sana como en la infectada por *Saprolegnia parasitica*. Recuentos bajos de bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas* y *Pseudomonas* fueron encontrados también por Horsley (1973) en la piel de salmón del Atlántico en oposición a su relativa abundancia en el agua de ríos, estuarios y mar. Este hecho podría indicar que la capa mucosa u otros factores asociados con los mecanismos de defensa de la piel sana de los peces podrían tener un efecto inhibitorio sobre estos géneros.

En relación a la flora cutánea de la trucha arcoíris, son destacables las diferencias encontradas respecto a las especies bacterianas entre las piscifactorías muestreadas. Estas diferencias también se observaron en la piel de trucha común en las distintas estaciones y puntos de muestreo, que junto a las relativas a los recuentos bacterianos, reforzarían la teoría de la influencia

del medio ambiente en la flora bacteriana de los peces señalada por diversos autores (Nieto y col., 1984; Horsley, 1973; Diler y col., 2000; Austin, 2006; Izvekova y col., 2007; Yang y col., 2007). En el presente estudio se encontró un gran número de miembros de la familia *Enterobacteriaceae* en la piel de trucha común en verano, especialmente en el río Omaña, que podría reflejar una mayor concentración de materia orgánica en el agua debido al estiaje y al riego de prados.

Spaangard y col. (2000) compararon la identificación fenotípica tradicional y la molecular de la flora intestinal de trucha arcoíris cultivada y encontraron una elevada concordancia entre ambas. En cambio, Hovda y col. (2007) citan diferencias en los resultados obtenidos con ambos métodos. En el presente estudio la concordancia entre ambos métodos fue alta, alcanzando una identificación más específica por medio de la secuenciación del gen 16S ARNr. Las galerías API no dieron buenos resultados y esto puede ser debido a que no están específicamente diseñadas para bacterias ambientales, tal como ha sido señalado por Austin y Austin (2007).

Como conclusión puede decirse que en la flora bacteriana cutánea de la trucha común y trucha arcoíris influyen factores como la estación del año, el hábitat de las truchas y la saprolegniosis, tanto en los aspectos cuantitativos como cualitativos.

En el próximo capítulo se estudiará el efecto inhibidor frente a *Saprolegnia parasitica* de las bacterias cutáneas más representativas.

Capítulo 5

Actividad inhibitoria de las bacterias cutáneas frente a *Saprolegnia parasitica* in vitro

5.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado anteriormente, los compuestos químicos que se utilizan para el control de la saprolegniosis presentan, en mayor o menor grado, ciertos inconvenientes. Una buena alternativa al uso de productos químicos podría ser la lucha biológica. Dado que existe poca información que profundice en el estudio del efecto inhibitorio que tienen las bacterias sobre *Saprolegnia parasitica*, se decidió investigar si las que están presentes en la flora cutánea de trucha común y trucha arcoíris poseen esta actividad en pruebas in vitro. También se estudió la acción fungicida de las bacterias que resultaron más inhibitorias, así como la capacidad de los sobrenadantes de los cultivos para inhibir el crecimiento de *S. parasitica,* lo que indicaría la producción de alguna sustancia extracelular inhibitoria. Todas estas pruebas in vitro constituyen un primer paso para seleccionar ciertas bacterias que podrían llegar a ser utilizadas en el control biológico de la saprolegniosis.

Por todo lo dicho los objetivos concretos de este estudio fueron los siguientes:

1. Conocer si las bacterias presentes en la piel de la trucha común y trucha arcoíris tienen capacidad para inhibir in vitro el crecimiento de *Saprolegnia parasitica.*

2. Conocer si las bacterias con efecto inhibitorio frente a *S. parasitica* presentan también acción letal in vitro sobre este organismo.

3. Conocer si las bacterias que inhiben a *S. parasitica* producen alguna sustancia extracelular responsable de la acción inhibitoria.

5.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La saprolegniosis se ha tratado tradicionalmente de forma eficaz con verde malaquita, pero su prohibición en la Unión Europea y otros países debido a sus efectos teratógenos y carcinógenos ha obligado a la búsqueda de nuevas sustancias químicas que puedan ser útiles en el tratamiento. Algunos de estos compuestos alternativos, unos más eficaces que otros, son los siguientes:

ácido paracético, bronopol, cloruro sódico, dióxido de cloro, formalina, hipoclorito sódico, permanganato potásico, peróxido de hidrógeno, sulfato de cobre y yodo. También el ozono, las sustancias húmicas y las radiaciones ultravioleta han sido probados para el control de la saprolegniosis.

El problema de muchos preparados químicos es que presentan riesgos potenciales para la salud pública y el medio ambiente, y en algunos casos pueden llevar a la aparición de resistencias entre los agentes patógenos (McKeegan y col., 2002; Wang y col., 2008), por lo que su uso debe ser minimizado. Además, ninguno de los productos utilizados en la actualidad para tratar la saprolegniosis es plenamente satisfactorio y de aplicación general, no proporcionando ninguno de los compuestos químicos disponibles una suficiente protección tras el periodo de cría (Forneris y col., 2003). La formalina, por ejemplo, es potencialmente perjudicial por su permanencia en el medio ambiente y posible efecto carcinógeno en mamíferos (Khomvilai y col., 2005; van West, 2006); el cloruro sódico, a pesar de su seguridad, presenta el problema de resultar poco económico por necesitarse una elevada concentración para ser efectivo; el peróxido de hidrógeno es corrosivo y altamente inflamable sin diluir (Khomvilai y col., 2005); el ozono, a pesar de su bajo impacto en el medio ambiente, no sirve para curar peces que ya están enfermos de saprolegniosis (van West, 2006); y el bronopol, aún siendo muy eficaz, resulta poco económico para su uso habitual en piscifactorías.

Por estos motivos se han buscado métodos alternativos al uso de compuestos químicos, como por ejemplo sustancias de origen natural (Muzzarelli y col., 2001; Tampieri y col., 2003; Khosravi y col., 2012). En los últimos años también ha ganado creciente atención la lucha biológica o biocontrol frente a *Saprolegnia* spp. Willoughby (1994) describió tres especies de hongos acuáticos que pueden parasitar las hifas de *Saprolegnia* patógena: *Olpidiopsis incrassata*, *Rozellopsis septigena* y *Woronina polycystis*. También se ha comprobado que algunas bacterias tienen acción inhibitoria in vitro frente a *Saprolegnia* spp. Así, Hatai y Willoughby (1988) observaron la inhibición de *Saprolegnia parasitica* por *Pseudomonas fluorescens* aislada de lesiones de trucha arcoíris con saprolegniosis. Estos autores probaron la inhibición del crecimiento del micelio mediante un ensayo en medio sólido. Petersen y col.

(1994) aislaron bacterias no identificadas, de varios orígenes, con poder inhibitorio frente a la germinación de los quistes de *S. parasitica* y otros *Oomycetes*, utilizando ensayos en medio sólido con una sustancia denominada BASF pluronic polyol F-127. Bly y col. (1997) también encontraron efectos inhibitorios frente a aislados patógenos de *Saprolegnia diclina, S. ferax, S. parasitica* y *Saprolegnia* sp.*,* mediante ensayos en medio sólido y líquido, utilizando un aislado de *Pseudomonas fluorescens* del agua de los estanques de una piscifactoría de *Ictalurus punctatus*. Meshram y col. (1998) descubrieron la acción antagonista de *Bacillus thuringiensi*s, aislado de peces enfermos, frente a varios patógenos in vitro entre ellos *Saprolegnia* sp., utilizando un ensayo en medio sólido. Bacterias de las especies *Aeromonas caviae, Aeromonas eucrenoplia, Pseudomonas accharophila, Pseudomonas alcaligenes, Pseudomonas fluorescens* y *Alteromonas* sp., obtenidas de lesiones de salmónidos con saprolegniosis, mostraron actividad inhibitoria in vitro frente a aislados patógenos de *S. parasitica* y *S. salmonis* mediante ensayos en medio sólido y líquido (Hussein y Hatai, 2001). *Aeromonas media* aislada de agua dulce inhibió tanto el crecimiento del micelio como la germinación de los quistes de *Saprolegnia* sp. en medio sólido (Lategan y Gibson, 2003). Zhang y col. (2008) encontraron efectos inhibitorios in vitro de algunas bacterias aisladas de agua de lago frente a *Saprolegnia* spp., entre ellas *Serratia marcescens*, mediante ensayos en medio sólido y líquido. Aislados de *Pseudomonas* sp. y *Janthinobacterium* sp., procedentes de huevos de trucha arcoíris, inhibieron a *Saprolegnia* sp. in vitro utilizando un método con cañamones (Korkea-aho y col., 2011). Ran y col. (2012) encontraron inhibición in vitro de *Saprolegnia ferax* en medio sólido por diversas cepas de *Bacillus* aisladas del intestino de *Ictalurus punctatus*. Nurhajati y col., (2012) vieron que una cepa de *Lactobacillus plantarum* aislada de alimento fermentado inhibía el crecimiento de *Saprolegnia parasitica* en medio sólido.

También existen estudios en los que se ha demostrado el efecto inhibitorio de bacterias frente a otros *Oomycetes* patógenos: *Pythium ultimum*, patógeno de las plantas, fue inhibido por *Pseudomonas* fluorescentes (Howell y Stipanovic, 1980; O´Sullivan y O`Gara, 1992; Russo y col., 1996); *Serratia plymuthica* previno la germinación de las zoosporas de *Aphanomyces*

euteiches y *Pythium ultimum* (Levenfors y col., 2004); y *Pseudomonas jessenii* inhibió a *Pythium aphanidermatum* (Abhinandan y col., 2008).

El control biológico en acuicultura puede definirse como un método de tratamiento que utiliza el antagonismo entre microbios, mediante el cual los agentes patógenos pueden ser destruidos o reducidos en número en el medio acuático (Maeda y col., 1997). Los mecanismos utilizados por los microorganismos beneficiosos incluyen la producción de sustancias inhibitorias frente a los agentes patógenos; la competición por nutrientes de vital importancia y por sitios de adhesión; el suplemento de nutrientes esenciales y enzimas que aumentan la nutrición del hospedador; la modulación de las interacciones con el medio ambiente; y el desarrollo de respuestas inmunitarias beneficiosas (Verschuere y col., 2000; Balcázar y col., 2006; Kesarcodi-Watson y col., 2008).

Se han comentado diversos mecanismos de acción por parte de las bacterias que tienen actividad inhibitoria in vitro frente a *Saprolegnia* spp. Uno de ellos es la producción de sustancias extracelulares (Hatai y Willoughby, 1988; Lategan y Gibson, 2003; Zhang y col., 2008). Sin embargo, también se han barajado otros mecanismos para inhibir a estos organismos, como la competición por el hierro y la capacidad de licuar la gelatina o de degradar la celulosa (Hatai y Willoughby, 1988; Bly y col., 1997).

En otros *Oomycetes* también se han detectado diversos mecanismos responsables de su inhibición por las bacterias. Petersen y col. (1994) observaron que algunas especies de *Pythium* y *Phytophphora* eran inhibidas por los sobrenadantes del cultivo bacteriano, y al aparecer estos efectos inhibitorios en diferentes tiempos de incubación de las bacterias, sugirieron que podrían estar implicados varios metabolitos secundarios producidos en diferentes momentos. También se ha observado la secreción de metabolitos implicados en la inhibición de *Aphanomyces euteiches* y *Pythium ultimatum* (Levenfors y col., 2004). *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. produjeron enzimas polisacarolíticas capaces de degradar la pared celular de *Pythium porphyrae* (Kitamura y col., 2002). Deora y col. (2008) descubrieron que *Pseudomonas*

jessenii producía una desorganización subcelular de la arquitectura de la actina en las hifas de *Pythium aphanidermatum*.

El efecto letal (fungicida) de las bacterias inhibitorias de *Saprolegnia* spp. sólo ha sido estudiado por Lategan y col. (2006), que observaron que el indol secretado por una aislado de *Aeromonas media* impedía el crecimiento de las hifas a partir de los quistes, incluso cuando ya no estaba presente la bacteria.

5.3. MATERIAL Y MÉTODOS

5.3.1. Pruebas de inhibición con bacterias

5.3.1.1. Aislados bacterianos y de *Saprolegnia*

Se seleccionaron 61 aislados representativos de todas las bacterias que habían sido obtenidas de la piel y de lesiones de saprolegniosis de trucha común y trucha arcoíris (ver capítulo 4), añadiéndose otros 11 aislados obtenidos en muestreos previos al del presente trabajo, con lo que el número total de aislados utilizados en las pruebas fue de 72 (cuadro 5.1).

Para probar la capacidad inhibitoria de las bacterias frente a *Saprolegnia parasitica* se utilizó el aislado TRU 8 obtenido de una trucha común con saprolegniosis del río Porma (Fregeneda-Grandes, 1998). Este aislado está caracterizado (Fregeneda-Grandes y col., 2000; Diéguez-Uribeondo y col., 2007) y ha mostrado elevada patogenicidad en infecciones experimentales en trucha arcoíris (Fregeneda-Grandes y col., 2001).

Cuadro 5.1. Bacterias de la piel y de lesiones de saprolegniosis de trucha común y trucha arcoíris en las que se estudió su acción inhibitoria in vitro sobre *Saprolegnia parasitica*

Bacteria	Referencia	Origen[1]	Lugar y fecha de aislamiento
Achromobacter xylosoxidans	LE 110	TCS	Río Omaña (El Castillo, 31-1-07)
Acinetobacter iwoffii	LE 71	TCSL	Canal de Villómar del río Porma-Esla (9-10-06)
Acinetobacter johnsonii	LE 4	TCS	Río Porma (Lugán, 26-10-05)
Acinetobacter johnsonii	LE 7	TCS	Río Porma (Lugán, 26-10-05)
Aeromonas piscicola	LE 21	TCSL	Centro Piscícola de Vegas del Condado (5-4-06)
Aeromonas. popoffii	LE 65	TCSL	Canal de Villómar del río Porma-Esla (9-10-06)
Aeromonas popoffii	LE 69	TCSL	Canal de Villómar del río Porma-Esla (9-10-06)
Aeromonas salmonicida	LE 9	TCSL	Centro Piscícola de Vegas del Condado (26-10-05)
Aeromonas salmonicida	LE 99	TCSL	Río Porma (Cerezales del Condado, 16-1-07)
Aeromonas sobria	LE 17	TCSL	Centro Piscícola de Vegas del Condado (5-4-06)
Aeromonas sobria	LE 20	TCSL	Centro Piscícola de Vegas del Condado (5-4-06)
Aeromonas sobria	LE 51	TCS	Río Omaña (El Castillo, 12-7-06)
Aeromonas sobria	LE 68	TCSL	Canal de Villómar del río Porma-Esla (9-10-06)
Aeromonas sobria	LE 74	TCSL	Centro Piscícola de Vegas del Condado (16-10-06)
Aeromonas sobria	LE 76	TCSL	Centro Piscícola de Vegas del Condado (16-10-06)
Aeromonas sobria	LE 80	TCS	Centro Piscícola de Vegas del Condado (16-10-06)
Aeromonas sobria	LE 104	TCSS	Centro Piscícola de Vegas del Condado (26-1-07)
Aeromonas sobria	LE 100	TCSL	Río Porma (Cerezales del Condado, 16-1-07)
Carnobacterium maltaromaticum	LE 103	TCSS	Centro Piscícola de Vegas del Condado (26-1-07)

Cuadro 5.1. Continuación

Bacteria	Referencia	Origen[1]	Lugar y fecha de aislamiento
Chryseobacterium sp.	LE 42	TCS	Centro Piscícola de Vegas del Condado (10-7-06)
Chryseobacterium sp.	LE 126	TAS	Piscifactoría del río Órbigo (Villanueva de Carrizo, 12-12-07)
Chryseobacterium sp.	LE 129	TAS	Piscifactoría del río Órbigo (Villanueva de Carrizo, 12-12-07)
Deefgea rivuli	LE 81	TCS	Río Omaña (El Castillo, 3-11-06)
Deefgea rivuli	LE 114	TCSS	Centro Piscícola de Vegas del Condado (9-1-08)
Deefgea rivuli	LE 146	TCSS	Centro Piscícola de Vegas del Condado (9-1-08)
Flavobacterium sp.	LE 34	TCS	Río Porma (Vegas del Condado, 10-7-06)
Flavobacterium sp.	LE 118	TCSL	Centro Piscícola de Vegas del Condado (9-1-08)
Flavobacterium sp.	LE 149	TCSS	Centro Piscícola de Vegas del Condado (9-1-08)
Frigoribacterium sp.	LE 136	TAS	Piscifactoría del río Porma (Castrillo del Condado, 13-12-07)
Iodobacter fluviatilis	LE 30	TCS	Río Porma (Vegas el Condado, 8-5-06)
Iodobacter sp.	LE 16	TCSL	Centro Piscícola de Vegas del Condado (6-3-06)
Iodobacter sp.	LE 23	TCSL	Centro Piscícola de Vegas del Condado (5-4-06)
Iodobacter sp.	LE 24	TCSL	Centro Piscícola de Vegas del Condado (5-4-06)
Iodobacter sp.	LE 25	TCSL	Centro Piscícola de Vegas del Condado (5-4-06)
Iodobacter sp.	LE 49	TCS	Río Omaña (El Castillo, 12-7-06)
Iodobacter sp.	LE 62	TCS	Río Porma (Castrillo del Condado, 6-10-06)
Iodobacter sp.	LE 96	TCSL	Río Porma (Cerezales del Condado, 16-1-07)
Janthinobacterium lividum	LE 95	TCS	Río Porma (Cerezales del Condado, 16-1-07)
Janthinobacterium sp.	LE 94	TCS	Río Porma (Cerezales del Condado, 16-1-07)
Kocuria rhizophila	LE 78	TCS	Centro Piscícola de Vegas del Condado (16-10-06)

Cuadro 5.1. Continuación

Bacteria	Referencia	Origen[1]	Lugar y fecha de aislamiento
Kurthia zopffii	LE 70	TCSL	Canal de Villómar del río Porma-Esla (9-10-06)
Microbacterium foliorum	LE 85	TCS	Río Porma (Cerezales del Condado, 16-1-07)
Microbacterium hydrocarbonoxydans	LE 41	TCS	Río Porma (Vegas del Condado, 10-7-06)
Microbacterium sp.	LE 46	TCS	Río Omaña (El Castillo, 12-7-06)
Moraxella osloensis	LE 137	TAS	Piscifactoría del río Porma (Castrillo del Condado, 13-12-07)
Pantoea agglomerans	LE 35	TCS	Río Porma (Vegas del Condado, 10-7-06)
Pantoea agglomerans	LE 36	TCS	Río Porma (Vegas del Condado, 10-7-06)
Pantoea agglomerans	LE 37	TCS	Río Porma (Vegas del Condado, 10-7-06)
Plantibacter sp.	LE 116	TCSS	Piscifactoría de Vegas del Condado (9-1-08)
Pseudomonas fluorescens	LE 89	TCS	Río Porma (Cerezales del Condado, 16-1-07)
Pseudomonas fluorescens	LE 98	TCSL	Río Porma (Cerezales del Condado, 16-1-07)
Pseudomonas fluorescens	LE 105	TCSL	Centro Piscícola de Vegas del Condado (26-1-07)
Pseudomonas fluorescens	LE 122	TCSL	Centro Piscícola de Vegas del Condado (9-1-08)
Pseudomonas fluorescens	LE 141	TAS	Piscifactoría del río Duerna (Velilla de la Valduerna, 17-1-08)
Pseudomonas fluorescens.	LE 143	TAS	Piscifactoría del río Duerna (Velilla de la Valduerna, 17-1-08)
Rhodococcus fascians	LE 15	TCS	Centro Piscícola de Vegas del Condado (6-3-06)
Rhodococcus fascians	LE 91	TCS	Río Porma (Cerezales del Condado, 16-1-07)
Rhodococcus sp.	LE 92	TCS	Río Porma (Cerezales del Condado, 16-1-07)
Serratia fonticola	LE 52	TCS	Río Omaña (El Castillo, 12-7-06)
Staphylococcus aureus	LE 14	TCS	Río Omaña (El Castillo, 28-10-05)
Staphylococcus equorum	LE 6	TCS	Río Porma (Lugán, 26-10-05)

Cuadro 5.1. Continuación

Bacteria	Referencia	Origen[1]	Lugar y fecha de aislamiento
Staphylococcus equorum	LE 11	TCSL	Centro Piscícola de Vegas del Condado (26-10-05)
Staphylococcus equorum	LE 13	TCSL	Centro Piscícola de Vegas del Condado (26-10-05)
Staphylococcus pasteuri	LE 83	TCS	Río Omaña (El Castillo, 3-11-06)
Staphylococcus sp.	LE 61	TCS	Río Porma (Castrillo del Condado, 6-10-06)
Staphylococcus sp.	LE 84	TCS	Río Omaña (El Castillo, 3-11-06)
Xanthomonas retroflexus	LE 38	TCS	Río Porma (Vegas del Condado, 10-7-06)
Yersinia enterocolitica	LE 27	TCS	Río Omaña (Aguasmestas, 21-4-06)
Yersinia enterocolitica	LE 31	TCS	Río Porma (Vegas del Condado, 8-5-06)
Yersinia kristensenii	LE 54	TCS	Río Omaña (El Castillo, 12-7-06)
Yersinia kristensenii	LE 55	TCS	Río Omaña (El Castillo, 12-7-06)
Yersinia kristensenii	LE 58	TCS	Río Omaña (El Castillo, 12-7-06)

[1] TCS: trucha común sana; TCSS: trucha común con saprolegniosis, piel sana; TCSL: trucha común con saprolegniosis, lesiones; TAS: trucha arcoíris sana.

5.3.1.2. Inhibición del crecimiento del micelio en medio sólido

Esta prueba se realizó siguiendo el método descrito por Hussein y Hatai (2001). Con cada aislado bacteriano se realizaron dos líneas de siembra, de 3 cm de largo separadas entre sí 3 cm, sobre agar BHI (agar cerebro-corazón, Cultimed). Con cada uno de los aislados se sembraron 6 placas de Petri, dos para cada uno de los tres tiempos de incubación utilizados de 3, 5 y 7 días a 20 ºC. Tras la incubación se colocó en el centro de la placa, entre ambas líneas de crecimiento bacteriano, una porción de agar de 3 mm de diámetro colonizado por *Saprolegnia parasitica*. Se prepararon placas testigo con *S. parasitica* y sin la bacteria. Tras incubar las placas otros 4 días a 20 ºC se midió el diámetro de la colonia de *S. parasitica* y se comparó con el obtenido en las placas testigo.

5.3.1.3. Inhibición del crecimiento del micelio en medio líquido con cañamón

Cada aislado bacteriano se inoculó en 3 ml de TSB (caldo soja triptona, Cultimed) incubándose a 20 ºC durante toda la noche. Después, 500 µl de este caldo se inocularon en 25 ml de TSB y se incubaron en un agitador orbital innova® 44 (New Brunswick Scientific) a 20 ºC y 200 rpm hasta alcanzar aproximadamente la mitad de la fase exponencial de crecimiento (ver apartado 3.3.3). Posteriormente se centrifugó este caldo a 1000 × *g* durante 15 min y, tras eliminar el sobrenadante, las bacterias se resuspendieron en suero fisiológico estéril (NaCl 0,9%). La concentración de bacterias se calculó mediante la lectura de la densidad óptica a 540 nm, equivalente a recuentos previos realizados en cámara de Neubauer (ver apartado 3.3.4.1), y se ajustó a 2×10^5 bacterias ml^{-1}. Tomando esta suspensión bacteriana como la primera dilución se realizaron otras 5 diluciones seriadas 1/10.

Saprolegnia parasitica TRU8 se cultivó durante 3 días a 20 ºC en agar GP y seguidamente se depositaron varias mitades de cañamones estériles sobre los bordes de la colonia, incubándose durante 24 h a 20 ºC para que fueran colonizados por *S. parasitica* (Fregeneda-Grandes, 1998) (ver apartado 3.2.1.1).

En una placa de cultivo celular con 24 pocillos (Falcon®) se depositó, en cada uno de ellos, 1 ml de cada dilución bacteriana, medio cañamón colonizado por *S. parasitica* y 1 ml de TSB como medio nutritivo. Se prepararon testigos negativos tanto de *S. parasitica* como de la bacteria, sustituyendo en el primero la suspensión bacteriana por suero fisiológico y en el segundo el cañamón colonizado por otro sin colonizar. Todos los pocillos se prepararon por duplicado. Las placas se incubaron durante 3 días a 20 ºC, observándose durante este periodo el crecimiento macroscópico y microscópico del micelio de *S. parasitica*, este último con un microscopio invertido Nikon DIAPHOT. Al tercer día se registró el crecimiento macroscópico de todos los pocillos.

5.3.1.4. Inhibición de la germinación de los quistes

La suspensión bacteriana se preparó de igual manera que para las pruebas con cañamón, pero se partió de una concentración de 4×10^5 bacterias ml^{-1} en la dilución inicial (ver apartado 5.3.1.3), para que la concentración final en el pocillo fuera la misma en las dos pruebas.

Las zoosporas se obtuvieron tal como se describe en el apartado 3.2.1.1. Los cañamones, una vez colonizados por las hifas de *Saprolegnia parasitica,* se trasplantaron a placas de Petri con 20 ml de agua RFE, a razón de tres cañamones por placa. Se dejaron incubar durante 36 h a 20 ºC (momento en el que se obtenía el mayor número de zoosporas) y el agua se pasó por un papel de filtro Whatman 541 esterilizado (15 min a 121 ºC), utilizándose un máximo de 10 placas con cada filtro (Fregeneda-Grandes, 1998). La filtración se llevó a cabo empleando embudos de vidrio, diseñados con un canuto que llegaba hasta el fondo del matraz para evitar que el agua se agitase, lo que favorece el enquistamiento de las zoosporas.

Para efectuar el recuento de las zoosporas se recogió una muestra del filtrado, que se introdujo en un frasco de 15 ml y se agitó vigorosamente durante unos segundos para inmovilizar las zoosporas y facilitar su recuento, lo que se efectuó con una cámara Hawksley Cristalite B.S. 748 de cristal recubierto de rodio, cuyo retículo tiene una capacidad de 10 mm^3. La concentración de zoosporas se calculó mediante la media aritmética de los

recuentos obtenidos de tres muestras distintas del filtrado. Finalmente, se ajustó la concentración de zoosporas a 4×10^4 zoosporas ml^{-1}.

Para realizar la prueba se utilizaron las placas de cultivo celular con 24 pocillos que se describieron en el apartado 5.3.1.3. En cada pocillo se depositó 0,5 ml de la dilución bacteriana, 0,5 ml de la suspensión de zoosporas de *S. parasitica* y 1 ml de TSB. Los testigos negativos se prepararon sustituyendo la suspensión bacteriana por suero fisiológico y la de zoosporas por agua RFE. Todos los pocillos se prepararon por duplicado. Las placas se incubaron a 20 ºC durante 3 días y a lo largo de la incubación se comprobó la germinación de los quistes y el crecimiento de las hifas. Los dos primeros días las placas se examinaron con un microscopio invertido Nikon DIAPHOT; posteriormente no fue necesario debido al crecimiento macroscópico del micelio.

5.3.2. Acción fungicida de las bacterias inhibitorias

Se utilizaron los 24 aislados bacterianos que produjeron la mayor inhibición de *Saprolegnia parasitica* en las tres pruebas con células bacterianas descritas anteriormente (cuadro 5.3, pág 81) y el mismo aislado de *S. parasitica* que en los anteriores experimentos.

Las suspensiones bacterianas y los cañamones colonizados por *S. parasitica* se prepararon como se ha descrito para la realización de las pruebas de inhibición de las bacterias sobre *S. parasitica* en medio líquido con cañamón (ver apartado 5.3.1.3).

El procedimiento de los ensayos fue como ya se ha comentado en las pruebas con cañamones. Tras añadir a los pocillos 1 ml de la dilución bacteriana, el cañamón colonizado por *S. parasitica* y 1 ml de TSB, cada pocillo por duplicado, las placas se incubaron durante tres periodos diferentes de 1, 2 y 3 días. Al finalizar la incubación, los cañamones en los que no hubo crecimiento del micelio se lavaron mediante 3 pases por frascos con agua destilada estéril y se depositaron individualmente en una placa de Petri con 20 ml de agua RFE, a la que se añadió estreptomicina y penicilina a una concentración de 2×10^2 mg l^{-1} y 2×10^5 UI l^{-1}, respectivamente. Se prepararon testigos negativos depositando un cañamón colonizado por *S. parasitica* en

agua con y sin antibióticos. Las placas se incubaron durante 20 días a 20 ºC y se observó diariamente el crecimiento del micelio bajo una lupa estereoscópica (Kiowa SD-2PL), considerando que existía efecto letal si no había crecimiento del micelio transcurrido ese periodo de tiempo. Se realizaron cultivos del agua en TSA a las 24 h para evitar falsos positivos debido al efecto inhibitorio de bacterias presentes en el micelio, repitiendo las pruebas cuando esto sucedía.

5.3.3. Pruebas de inhibición con los sobrenadantes de los cultivos bacterianos

5.3.3.1. Preparación de los sobrenadantes

Se utilizaron los 24 aislados bacterianos y el de *Saprolegnia parasitica* citados en el apartado 5.3.2. Los sobrenadantes bacterianos se prepararon según el método descrito por Lategan y Gibson (2003). Cada aislado bacteriano se sembró en 3 ml de TSB y se incubó a 25 ºC durante 24 h. Una alícuota de 250 µl de este caldo se inoculó en un matraz con 200 ml de TNPB (caldo triptona peptona neutralizada: 7 g l^{-1} de triptona, 5 g l^{-1} de soja peptona neutralizada y 5 g l^{-1} de cloruro sódico) y se incubó a 25 ºC y 180 rpm en un agitador orbital innova® 44 (New Brunswick Scientific) durante 36 h. Después, los cultivos se inactivaron mediante calor en un baño Memmert WNB 14 a 70 ºC durante 1 h. El caldo se centrifugó a 15 000 × *g* durante 20 min y posteriormente se recogió el sobrenadante que se filtró utilizando una jeringa con un filtro de 0,22 µm de poro (Acrodisc®). El pH de los sobrenadantes se midió con un pH Meter BASIC 20 Crison y se ajustó a 7,0 con HCl 1N. Tomando cada sobrenadante como la dilución inicial se realizaron 3 diluciones dobles en TNPB.

La preparación de los cañamones colonizados y de las zoosporas de *S. parasitica* necesarias para efectuar las pruebas se prepararon como se describe en los apartados 5.3.1.3 y 5.3.1.4.

5.3.3.2. Inhibición del crecimiento del micelio en medio líquido con cañamón

Los ensayos se realizaron en las placas de cultivo celular con 24 pocillos mencionadas anteriormente. En cada pocillo se depositó 2 ml de la dilución del sobrenadante y medio cañamón colonizado por *Saprolegnia parasitica*. También se prepararon como testigos negativos pocillos con TNPB en lugar de los sobrenadantes. Todos los pocillos se prepararon por duplicado. Se utilizaron los mismos procedimientos de observación que en las pruebas con bacterias (ver apartado 5.3.1.3).

5.3.3.3. Inhibición de la germinación de los quistes

Se utilizaron las ya citadas placas de cultivo celular, depositándose en cada pocillo 1 ml de la dilución del sobrenadante y 1 ml de la suspensión de zoosporas. En los testigos negativos se sustituyó el sobrenadante por TNPB. Todos los pocillos se prepararon por duplicado. Se utilizaron los mismos procedimientos de observación que en las pruebas con bacterias (ver apartado 5.3.1.4).

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Pruebas de inhibición con bacterias

5.4.1.1. Inhibición del crecimiento del micelio en medio sólido

Las diferencias en el grado de inhibición entre los aislados bacterianos fueron mayores cuando *Saprolegnia parasitica* se enfrentó a cultivos bacterianos de 7 días, por lo que este tiempo de incubación fue el utilizado para estimar el grado de inhibición de todos los aislados. El diámetro de la colonia de *S. parasitica* en los testigos fue de 4 cm tras los 4 días de incubación (fig. 5.1). Se consideró que los aislados bacterianos tenían actividad inhibitoria cuando el diámetro de la colonia de *S. parasitica* era de 2,5 cm o inferior, pues fue el diámetro máximo alcanzado en las placas con bacterias, y a su vez inferior al alcanzado en las placas testigo (fig. 5.1 y 5.2); esta inhibición se presentó con los 72 aislados, y se clasificó en tres niveles dependiendo del

diámetro alcanzado por la colonia de *S. parasitica* (cuadro 5.2). Cuarenta y siete aislados bacterianos tuvieron un efecto inhibitorio alto, ya que con 7 días de incubación de la bacteria antes de enfrentarla a *S. parasitica* inhibieron completamente el crecimiento del micelio (diámetro de la colonia < 0,7 cm) (fig. 5.3). Estos aislados pertenecían a las especies *Achromobacter xylosoxidans, Acinetobacter johnsonii, Aeromonas piscicola, Aeromonas popoffii, Aeromonas salmonicida, Aeromonas sobria, Chryseobacterium* sp., *Flavobacterium* sp., *Iodobacter fluviatilis, Iodobacter* sp., *Janthinobacterium lividum, Janthinobacterium* sp., *Kocuria rhizophila, Kurthia zopfii, Microbacterium foliorum, Microbacterium hydrocarbonoxydans, Pantoea agglomerans, Pseudomonas fluorescens, Serratia fonticola, Xanthomonas retroflexus y Yersinia kristensenii,* y 22 de ellos (46,8%) habían sido aislados de lesiones de saprolegniosis.

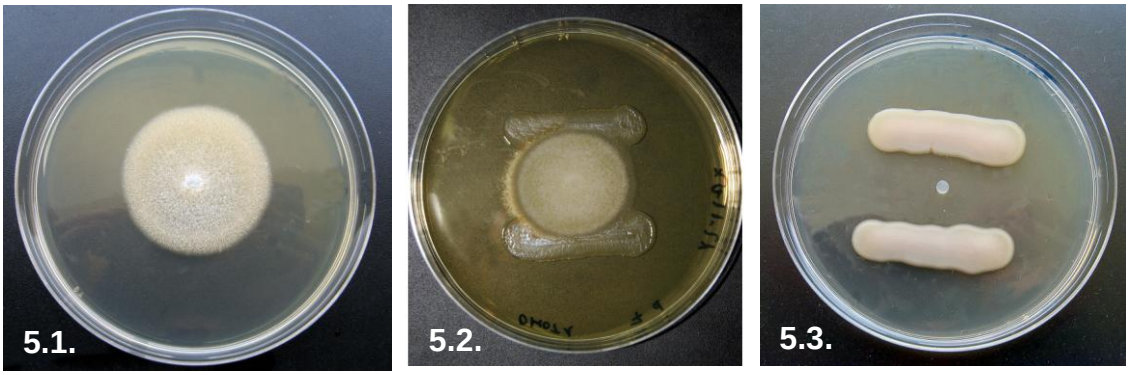


Fig. 5.1 a 5.3. Inhibición del crecimiento de *Saprolegnia parasitica* con bacterias. Primero se incubó la bacteria (estrías paralelas) a 20 ºC durante 7 días en agar BHI y seguidamente *S. parasitica* durante 4 días. **5.1.** Testigo negativo. **5.2.** Inhibición baja producida por *Deefgea* sp. **5.3.** Inhibición alta producida por *Xanthomonas retroflexus.*

Cuadro 5.2. Grado de inhibición del crecimiento de *Saprolegnia parasitica* producido por 72 aislados bacterianos en agar BHI (prueba en placa), en medio líquido con una semilla de cáñamo colonizada por *S. parasitica* (prueba con cañamón) y en medio líquido con quistes (prueba con quistes).

Tipo de prueba	Grado de inhibición	Graduación de la actividad inhibitoria	Nº de bacterias (%)
Prueba en placa		*Diámetro de la colonia de S. parasitica tras 4 días a 20 ºC* [(1)]	
	Bajo	Entre 1,5 y 2,5 cm	13 (18,06)
	Medio	Entre 0,7 y 1,5 cm	12 (16,67)
	Alto	Menos de 0,7 cm	47 (65,28)
Prueba con cañamón		*Inhibición total del crecimiento macroscópico del micelio a los 3 días a 20 ºC*	
	Bajo	Con 2×10^5 bacterias	10 (13,89)
	Medio	Con 2×10^4 bacterias	5 (6,94)
	Alto	Con $\leq 2 \times 10^3$ bacterias	26 (36,11)
Prueba con quistes		*Inhibición total del crecimiento macroscópico del micelio a los 3 días a 20 ºC*	
	Bajo	Con 2×10^5 bacterias	16 (22,22)
	Medio	Con 2×10^4 y 2×10^3 bacterias	9 (12,5)
	Alto	Con $\leq 2 \times 10^2$ bacterias	27 (37,5)

[(1)] Añadiendo *S. parasitica* tras incubar la bacteria durante 7 días a 20 ºC.

5.4.1.2. Inhibición del crecimiento del micelio en medio líquido con cañamón

La ausencia total del crecimiento del micelio a los tres días de incubación fue utilizada como indicador de actividad inhibitoria (fig. 5.4 a 5.6). De los 72 aislados bacterianos, 41 (56,9%) inhibieron totalmente el crecimiento del micelio de *Saprolegnia parasitica*, pero a diferentes diluciones. Se establecieron tres niveles de inhibición dependiendo de la concentración mínima de bacterias necesarias para producirla (cuadro 5.2). Dentro del grupo de inhibición alta, hubo 8 aislados que consiguieron inhibir el crecimiento del

micelio hasta la quinta dilución (10 bacterias ml^{-1}) y que pertenecieron a las especies *Aeromonas popoffii* (1)*, Aeromonas salmonicida* (2) y *Aeromonas sobria* (5), todos procedentes de lesiones de saprolegniosis.

Fig. 5.4 a 5.6. Inhibición con bacterias, del crecimiento del micelio de *Saprolegnia parasitica* a los 3 días de incubación a 20 ºC en medio líquido con cañamón. **5.4.** Cada fila de la placa contiene una bacteria a diferentes concentraciones, de mayor a menor y de izquierda a derecha; las bacterias son, de arriba abajo, *Deefgea rivuli* (1), *Iodobacter fluviatilis* (1) y *Aeromonas sobria* (2). **5.5.** Testigo negativo con crecimiento abundante de *S. parasitica.* **5.6.** Inhibición de *S. parasitica* producida por un aislado de *Aeromonas sobria*.

5.4.1.3. Inhibición de la germinación de los quistes

Ninguno de los aislados bacterianos inhibió totalmente la germinación de los quistes, siendo el crecimiento del micelio inversamente proporcional a la concentración de bacterias. Se consideró actividad inhibitoria la ausencia total de crecimiento macroscópico del micelio a los tres días de incubación, lo que ocurrió con 52 de los 72 aislados (72,2%). Con los otros 20 aislados y en el testigo sí hubo crecimiento macroscópico del micelio (fig. 5.7). Se establecieron tres grados de inhibición dependiendo de la concentración mínima de bacterias para producirla (cuadro 5.2). De los aislados que tuvieron el grado de inhibición más alto, 17 lo lograron hasta la quinta dilución (10 bacterias ml^{-1}). Estos aislados bacterianos con mayor grado de inhibición pertenecieron a las especies *Aeromonas piscicola* (1), *Aeromonas popoffii* (1), *Aeromonas salmonicida* (2), *Aeromonas sobria* (7), *Pantoea agglomerans* (1) y *Pseudomonas fluorescens* (5), y 11 de ellos (64,7%) habían sido aislados de lesiones de saprolegniosis.

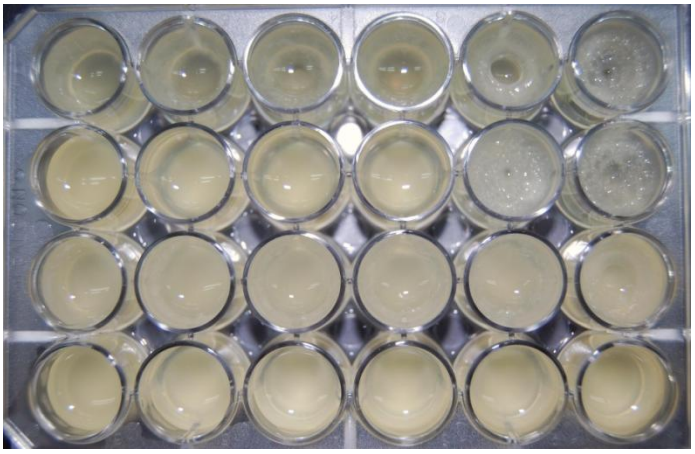


Fig. 5.7. Inhibición con bacterias de la germinación de los quistes de *Saprolegnia parasitica* a los 3 días de incubación a 20 ºC en medio líquido. Cada fila de la placa contiene diferentes concentraciones de una bacteria, de mayor a menor y de izquierda a derecha. Las bacterias probadas son, de arriba abajo, *Iodobacter* sp. (1), *Aeromonas piscicola* (1), *Pseudomonas fluorescens* (1) y *Aeromonas popoffii* (1).

5.4.2. Acción fungicida de las bacterias inhibitorias

De los 24 aislados bacterianos probados, 15 presentaron actividad letal frente a *Saprolegnia parasitica* bajo las diferentes condiciones probadas. Tras los 20 días de incubación se pudo observar un pequeño micelio atrofiado y de color parduzco, en contraste con los cultivos testigo y los de las bacterias no fungicidas, en los que el micelio creció y produjo zoosporas. Las bacterias mostraban este efecto sólo hasta la segunda dilución (2×10^4 bacterias por pocillo), e incubando la bacteria con el cañamón al menos durante dos días a 20 ºC. Los aislados bacterianos que mostraban su acción fungicida a menores concentraciones y con menor tiempo de incubación fueron 8 y pertenecían a las especies *Aeromonas piscicola* (1), *Aeromonas popoffii* (1), *Aeromonas sobria* (2), *Pantoea agglomerans* (2), *Pseudomonas fluorescens* (1) y *Serratia fonticola* (1). Dos de los aislados (25%) procedían de lesiones de saprolegniosis.

5.4.3. Aislados bacterianos más inhibitorios

En el cuadro 5.3 se resumen los resultados de las pruebas de inhibición con los 24 aislados bacterianos más inhibitorios frente a *Saprolegnia parasitica*.

Se consideraron los aislados con mayor efecto inhibitorio aquellos que presentaron una inhibición alta de *Saprolegnia parasitica* en el ensayo en medio sólido, que consiguieron impedir el crecimiento del micelio en medio líquido con las concentraciones más bajas de bacterias y que a su vez fueron fungicidas (figuran con un asterisco en el cuadro 5.3). Estos aislados pertenecían a las especies *Aeromonas piscicola* (1), *Aeromonas sobria* (1), *Pantoea agglomerans* (1) y *Pseudomonas fluorescens* (3), y un alto porcentaje de ellos (66,6%) procedían de lesiones de saprolegniosis. Otros aislados produjeron la inhibición más alta en todos los ensayos pero no fueron letales frente a *S. parasitica*: *Aeromonas popoffii* (1), *Aeromonas salmonicida* (2) y *Aeromonas sobria* (4), todos ellos obtenidos de lesiones de saprolegniosis.

5.4.4. Pruebas de inhibición con los sobrenadantes de los cultivos bacterianos

5.4.4.1. Inhibición del crecimiento del micelio en medio líquido con cañamón

De los 24 sobrenadantes bacterianos probados, 19 fueron inhibitorios frente a *Saprolegnia parasitica* a los tres días de incubación a 20 ºC. Se establecieron dos niveles de inhibición: alta, si el crecimiento del micelio era impedido totalmente; y baja, si el crecimiento era reducido en comparación con el del testigo. La inhibición alta fue conseguida sólo con la primera dilución de los sobrenadantes, y se observó con 10 aislados que pertenecían a las especies *Aeromonas piscicola* (1), *Aeromonas popoffii* (2), *Aeromonas salmonicida* (2) y *Aeromonas sobria* (5), procedentes todos excepto uno (90%) de lesiones de saprolegniosis (cuadro 5.3).

5.4.4.2. Inhibición de la germinación de los quistes

De los 24 sobrenadantes bacterianos, 20 consiguieron inhibir el crecimiento del micelio a partir de los quistes de *Saprolegnia parasitica*, pero no su germinación. A los 3 días de incubación a 20 ºC, los sobrenadantes de 14 aislados bacterianos consiguieron una inhibición alta con la primera dilución (ausencia total de micelio) (fig. 5.8). Estos aislados, cuyos sobrenadantes tuvieron un efecto inhibitorio mayor, fueron los pertenecientes a las especies

Aeromonas piscicola (1), *Aeromonas popoffii* (2), *Aeromonas salmonicida* (2), *Aeromonas sobria* (6), *Pseudomonas fluorescens* (2) y *Xanthomonas retroflexus* (1), y 11 de ellos (78,6%) fueron aislados de lesiones de saprolegniosis (cuadro 5.3).

Fig. 5.8. Inhibición con sobrenadantes bacterianos, de la germinación de los quistes y de la formación de micelio de *Saprolegnia parasitica* a los 3 días a 20 ºC en medio líquido. Cada sobrenadante (dos pocillos) de izquierda a derecha y de arriba abajo, corresponde a las siguientes bacterias: *Xanthomonas retroflexus* (1), *Aeromonas piscicola* (1), *Aeromonas sobria* (1), *Pseudomonas fluorescens* (1), *Pantoea agglomerans* (1), *Serratia fonticola* (1), *Yersinia kristensenii* (1), *Pseudomonas fluorescens* (1), *Aeromonas salmonicida* (1) y *Aeromonas sobria* (2); los dos últimos pocillos pertenecen al testigo negativo.

Cuadro 5.3. Resultados de las pruebas in vitro realizadas con los 24 aislados bacterianos que presentaron mayor actividad inhibitoria frente a *Saprolegnia parasitica* (ver el grado de inhibición en el Cuadro 5.2)

Bacteria	Referencia	Origen [1]	Inhibición en medio sólido	Pruebas en medio líquido		Efecto fungicida	Actividad inhibitoria del sobrenadante	
				Con cañamón[2]	Con quistes[2]		Con cañamón[3]	Con quistes [3]
*Aeromonas piscicola**	LE 21	TCSL	Alta	Alta (200)	Alta (20)	Sí	Alta	Alta
Aeromonas popoffii	LE 65	TCSL	Alta	Alta (20)	Alta (20)	No	Alta	Alta
Aeromonas popoffii	LE 69	TCSL	Alta	Alta (200)	Alta (200)	Sí	Alta	Alta
Aeromonas salmonicida	LE 9	TCSL	Alta	Alta (20)	Alta (20)	No	Alta	Alta
Aeromonas salmonicida	LE 99	TCSL	Alta	Alta (20)	Alta (20)	No	Alta	Alta
Aeromonas sobria	LE 17	TCSL	Alta	Alta (20)	Alta (20)	No	Alta	Baja
Aeromonas sobria	LE 51	TCS	Alta	Alta (2000)	Alta (20)	Sí	Alta	Alta
Aeromonas sobria	LE 68	TCSL	Alta	Alta (20)	Alta (20)	No	Alta	Alta
*Aeromonas sobria**	LE 74	TCSL	Alta	Alta (200)	Alta (20)	Sí	Baja	Alta
Aeromonas sobria	LE 76	TCSL	Alta	Alta (20)	Alta (20)	No	Alta	Alta
Aeromonas sobria	LE 100	TCSL	Alta	Alta (20)	Alta (20)	No	Baja	Alta
Aeromonas sobria	LE 104	TCS	Alta	Alta (20)	Alta (20)	Sí	Alta	Alta

Cuadro 5.3. Continuación

Bacteria	Referencia	Origen [1]	Inhibición en medio sólido	Pruebas en medio líquido		Efecto fungicida	Actividad inhibitoria del sobrenadante	
				Con cañamón[2]	Con quistes[2]		Con cañamón[3]	Con quistes [3]
Pantoea agglomerans	LE 35	TCS	Alta	Alta (2000)	Alta (200)	Sí	No	No
Pantoea agglomerans	LE 36	TCS	Alta	Alta (2000)	Alta (200)	Sí	No	No
*Pantoea agglomerans**	LE 37	TCS	Alta	Alta (200)	Alta (20)	Sí	Baja	Baja
Pseudomonas fluorescens	LE 89	TCS	Alta	Alta (2000)	Alta (20)	Sí	Baja	Alta
*Pseudomonas fluorescens**	LE 98	TCSL	Alta	Alta (200)	Alta (20)	Sí	Baja	Baja
*Pseudomonas fluorescens**	LE 122	TCSL	Alta	Alta (200)	Alta (20)	Sí	Baja	Alta
Pseudomonas fluorescens	LE 141	TAS	Alta	Alta (200)	Alta (20)	No	Baja	Baja
*Pseudomonas fluorescens**	LE 143	TAS	Alta	Alta (200)	Alta (20)	Sí	Baja	Baja
Serratia fonticola	LE 52	TCS	Alta	Alta (2000)	Alta (200)	Sí	No	No
Xanthomonas retroflexus	LE 38	TCS	Alta	Alta (2000)	Alta (200)	No	Baja	Alta
Yersinia kristensenii	LE 54	TCS	Alta	Alta (2000)	Alta (200)	Sí	No	No
Yersinia kristensenii	LE 58	TCS	Alta	Alta (2000)	Alta (200)	Sí	No	Baja

* Estos aislados fueron considerados los más inhibitorios teniendo en cuenta el número mínimo de bacterias necesarias para la inhibición de *S. parasitica* en las pruebas en medio líquido y el efecto fungicida.

[1] TCS = Trucha común sana; TCSL = Trucha común con saprolegniosis, lesiones; TAS = Trucha arcoíris sana.

[2] Entre paréntesis, número mínimo de bacterias que causa la inhibición total del crecimiento macroscópico del micelio de *S. parasitica*.

[3] Inhibición alta: ausencia total del crecimiento de *S. parasitica* con la primera dilución a los tres días de incubación a 20 °C. Inhibición baja: inhibición parcial del crecimiento macroscópico del micelio con la primera dilución

5.5. DISCUSIÓN

Se comprobó que algunas bacterias pertenecientes a la flora cutánea de trucha común y trucha arcoíris inhibían in vitro el crecimiento de *Saprolegnia parasitica*, observándose que las bacterias más inhibitorias pertenecían a los géneros *Aeromonas* y *Pseudomonas*.

Los ensayos de inhibición en medio sólido se realizaron utilizando tres tiempos de incubación de la bacteria (3, 5 y 7 días), pero la inhibición fue más acusada con los cultivos de 7 días, lo que coincide con lo observado por Hussein y Hatai (2001). Una posible explicación es que la bacteria tendría más tiempo para elaborar alguna sustancia inhibitoria o para consumir ciertos nutrientes necesarios para el crecimiento del micelio de *S. parasitica*.

Los resultados de esta prueba mostraron que la inhibición en medio sólido es menos específica que el resto de las pruebas para graduar la actividad inhibitoria de las diferentes bacterias, ya que en agar BHI todas ellas redujeron el crecimiento de *S. parasitica* a diferentes niveles, y unos dos tercios de los 72 aislados estudiados fueron capaces de inhibirlo completamente. Además, las bacterias que presentaron inhibición alta en medio líquido también lo hicieron en medio sólido, pero no a la inversa. Hussein y Hatai (2001) observaron inhibición con 5 de 47 aislados bacterianos (10,7%) utilizando agar HI, aunque posteriormente comprobaron que la actividad inhibitoria de las bacterias aumentaba en agar BHI. Sin embargo, Zhang y col. (2008) realizaron ensayos en agar BHI con 130 bacterias y sólo 3 de ellas (2,3%) inhibieron a especies patógenas de *Saprolegnia*. Estos últimos autores demostraron que la composición del medio de cultivo podía afectar la capacidad inhibitoria de una cepa de *Serratia marcescens* frente a *Saprolegnia* spp., obteniendo la mayor inhibición en agar dextrosa-patata seguida del agar BHI.

En medio líquido no se inhibió la germinación de los quistes pero sí el crecimiento del micelio, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Bly y col. (1997), pero en nuestro caso la inhibición se produjo a concentraciones de bacterias aún más bajas que las observadas por estos autores. Sin embargo, en otros estudios (Lategan y Gibson, 2003, Zhang y col., 2008) sí se

observó inhibición de la germinación de los quistes, aunque los ensayos fueron realizados en medio sólido utilizando TSA, por lo que los resultados no son comparables.

Para inhibir el crecimiento del micelio en medio líquido generalmente fueron necesarias concentraciones mayores de bacterias cuando se utilizaron cañamones colonizados por *S. parasitica* que en el caso de los quistes. Una posible explicación (ningún otro autor ha realizado esta prueba con cañamones colonizados y quistes) podría ser el hecho de que en el cañamón ya están presentes las hifas, por lo que se necesitarían más bacterias para impedir su proliferación, mientras que los quistes tienen que germinar para dar lugar a las primeras hifas que a su vez necesitan más tiempo para formar un micelio visible macroscópicamente.

Los aislados bacterianos con un mayor grado de inhibición en las tres pruebas con células bacterianas pertenecían a los géneros *Aeromonas, Pantoea* y *Pseudomonas*, seguidos por algunas enterobacterias y *Xanthomonas retroflexus*, la mayor parte de todos ellos procedentes de lesiones de saprolegniosis. Hatai y Willoughby (1988) y Hussein y Hatai (2001) también aislaron de lesiones bacterias inhibitorias, de los géneros *Aeromonas* y *Pseudomonas*, además de *Alteromonas*. En cambio, Petersen y col. (1994) encontraron bacterias no identificadas antagonistas frente a *S. parasitica* en el moco de truchas arcoíris sanas, pero no en el moco de las que tenían saprolegniosis. El hecho de aislar bacterias inhibitorias en las lesiones puede ser relevante, ya que según Hussein y Hatai (2001), las interacciones microbianas en las zonas de lesión podrían explicar por qué algunos peces se recuperan espontáneamente de la saprolegniosis y otros no.

La actividad inhibitoria frente a *Saprolegnia* spp. de *Pseudomonas fluorescens* y *Serratia* spp. ha sido descrita por varios autores (Hatai y Willoughby, 1988; Bly y col., 1997; Zhang y col., 2008). *Pseudomonas* sp. también ha mostrado ser eficaz frente a *Phytium*, oomyceto patógeno de las plantas (Howell y Stipanovic, 1980; O´Sullivan y O´Gara, 1992; Russo y col., 1996). En el presente trabajo la mayoría de bacterias identificadas como *Pseudomonas fluorescens* mostraron una actividad inhibitoria bastante alta,

especialmente en medio sólido y frente al crecimiento del micelio a partir de quistes de *Saprolegnia parasitica*. También un aislado de *Serratia fonticola* fue de los más inhibitorios.

Se comprobó que algunas de las bacterias presentaban efecto letal frente a *Saprolegnia parasitica*, al igual que Lategan y col. (2006) que también lo demostraron con la sustancia extracelular secretada por *Aeromonas media*, frente a los quistes y las hifas de *S. parasitica*. Este es un resultado interesante, ya que las bacterias podrían no sólo evitar la infección, sino también curar lesiones incipientes. En nuestro caso las bacterias con mayor efecto fungicida pertenecían a diferentes géneros, entre ellos algunas de las enterobacterias que no eran tan inhibitorias como el resto.

Se desconocen con exactitud los mecanismos de inhibición de las bacterias sobre *Saprolegnia* spp*.* in vitro, pero el hecho de que estén afectados tanto el crecimiento vegetativo a partir del micelio establecido, como de los quistes, podría tener implicaciones significativas en su empleo para controlar la saprolegniosis en las piscifactorías (Lategan y Gibson, 2003). En nuestro estudio, los sobrenadantes de la mayoría de las bacterias más inhibitorias mostraron también esta actividad, lo que sugiere que existe una sustancia o sustancias extracelulares responsables o partícipes de ese efecto. Lategan y Gibson (2003) demostraron que una sustancia secretada por un aislado de *Aeromonas media* era responsable de la inhibición de *Saprolegnia* sp. y otros agentes patógenos. Posteriormente identificaron que el componente fundamental de esta sustancia era el indol (Lategan y col., 2006). También Zhang y col. (2008) encontraron efectos inhibitorios en el sobrenadante de un aislado de *Serratia marcescens* frente a *Saprolegnia* spp*.* En cambio, Bly y col. (1997) no observaron inhibición empleando sobrenadantes de *Pseudomonas fluorescens,* al contrario que en nuestro caso con aislados de la misma especie bacteriana*.* Sin embargo, estos autores realizaron los ensayos sólo en medio sólido. Hussein y Hatai (2001) tampoco encontraron inhibición con los sobrenadantes bacterianos, incluso haciendo ensayos en medio líquido. Debido a estos resultados tan contradictorios se han sugerido otros mecanismos para inhibir a *Saprolegnia* spp., como la competición por el hierro y la capacidad de

licuar la gelatina o de degradar la celulosa (Hatai y Willoughby, 1988; Bly y col., 1997; Hussein y Hatai, 2001).

Los sobrenadantes utilizados en el presente estudio, al igual que las bacterias, fueron más inhibitorios frente al crecimiento del micelio a partir de los quistes que en las pruebas con cañamón, en los que el micelio ya estaba desarrollado. Esta mayor sensibilidad de los quistes que de las hifas a los sobrenadantes bacterianos también la observaron Zhang y col. (2008).

Nuevamente, los sobrenadantes con un mayor efecto inhibitorio fueron los de las bacterias del género *Aeromonas.* Las enterobacterias que presentaban un efecto inhibitorio bastante elevado frente a *Saprolegnia parasitica*, pero a concentraciones algo mayores que las demás bacterias inhibitorias, no produjeron sobrenadantes con acción inhibitoria. Dado que estas enterobacterias fueron fungicidas podrían tener algún otro mecanismo capaz de matar a *S. parasitica*, como por ejemplo la competición por algún nutriente. Asimismo, la menor inhibición de *S. parasitica* por estos aislados podría ser explicada por la ausencia de secreción de sustancias extracelulares.

Las bacterias que han mostrado tener un mayor efecto inhibitorio frente a *Saprolegnia parasitica* en las pruebas realizadas, pertenecientes principalmente a los géneros *Aeromonas* y *Pseudomonas*, podrían ser buenas candidatas para la lucha biológica frente a la saprolegniosis. En los próximos capítulos se profundizará en su estudio.

Capítulo 6

Patogenicidad para la trucha arcoíris de las bacterias inhibitorias de *Saprolegnia parasitica*

6.1. INTRODUCCIÓN

La utilización de un microorganismo vivo en la lucha biológica frente al agente patógeno causante de una enfermedad infecciosa, lógicamente debe llevar implícito el que dicho microorganismo sea inocuo para el animal en el que se pretende emplear. En el presente capítulo se investiga si las bacterias que inhibieron a *Saprolegnia parasitica* in vitro, descritas en los capítulos anteriores, son apatógenas para la trucha arcoíris.

6.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Antes de utilizar un microorganismo vivo en el biocontrol de la saprolegniosis debe tenerse en cuenta que el hecho de que sea antagónico de *Saprolegnia parasitica* no excluye el que pueda causar otro tipo de enfermedad en el hospedador (Bly y col., 1997; Hussein y Hatai, 2001). Por lo tanto es importante demostrar la inocuidad de las bacterias que se quieren utilizar como posibles probióticos en la lucha frente a una determinada enfermedad (Salminen y col., 1999; Verschuere y col., 2000; Wang y col., 2008), incluso con ensayos a largo plazo para asegurar que la bacteria mantiene su inocuidad y evitar el riesgo de que aparezcan mutantes con efectos perjudiciales (Gatesoupe, 1999). Con este objetivo se realizan desafíos mediante inyección del microorganismo o su adición al agua. Por ejemplo, Irianto y Austin (2002) probaron la patogenicidad en trucha arcoíris de aislados de *Vibrio fluvialis* y *Aeromonas hydrophila* que utilizaron como posibles probióticos frente a la furunculosis; Brunt y Austin (2005) probaron un aislado de *Aeromonas sobria* en trucha arcoíris antes de utilizarlo en ensayos in vivo frente a *Lactococcus garvieae* y *Streptococcus iniae*; Brunt y col. (2007) lo hicieron con *Bacillus* sp. y *Aeromonas sobria*, posibles probióticos frente a varios patógenos de peces; Newaj-Fyzul y col. (2007) estudiaron la patogenicidad de *Bacillus subtilis* antes de probar si controlaba la infección por *Aeromonas* en trucha arcoíris; Vendrell y col. (2007) descartaron la patogenicidad de dos bacterias lácticas antes de enfrentarlas in vivo a *Lactococcus garvieae* en trucha arcoíris; Aly y col. (2008) probaron si *Bacillus firmus*, *Bacillus pumilus* y *Citrobacter freundii* eran inocuas en tilapia (*Oreochromis niloticus*); y Korkea-aho y col. (2011) comprobaron la

inocuidad de un aislado de *Pseudomonas* sp. en trucha arcoíris antes de usarlo en la lucha frente a *Flavobacterium psychrophilum*.

6.3. MATERIAL Y MÉTODOS

6.3.1. Peces y tanques

Se utilizaron individuos juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de 8 a 10 meses de edad, de unos 16 cm de longitud (16,8 ± 2,0) y 53 g de peso (53 ± 16,2), procedentes de la Piscifactoría Carrizo, situada junto al río Órbigo en Villanueva de Carrizo (León). Esta piscifactoría se dedica al engorde de alevines, traídos de Moreda (Asturias), hasta la talla comercial.

El transporte de los peces se realizó en bidones de plástico de 40 litros con agua de la propia piscifactoría. Cuando fue necesario se aplicó oxígeno a través de un difusor de cerámica (Renacer®, Rena) conectado a una bombona de oxígeno de 5 L (ver apartado 3.2.2).

A su llegada a la Universidad de León las truchas se anestesiaron por inmersión en agua con 50 ppm de MS-222® (Tricaína metano sulfonato, Sigma), se pesaron y contaron. Seguidamente se colocaron en tanques cilíndricos con 85 litros de agua a 12-15 ºC y flujo continuo (aproximadamente 200 ml min^{-1}), manteniéndose en aclimatación durante un periodo mínimo de 7 días antes de inocularlas con las bacterias. Todos los tanques tenían suministro de oxígeno mediante un aireador Rena 301 conectado a un difusor de cerámica de 15 cm. Las truchas se alimentaron todos los días con el mismo pienso comercial utilizado en la piscifactoría de procedencia (1% del peso vivo), retirándose las heces del tanque diariamente. Durante este periodo de tiempo se examinaron los peces para comprobar que no presentaban signos ni lesiones de enfermedad.

Para las inoculaciones se emplearon tanques iguales a los de aclimatación, con las mismas condiciones de renovación de agua, temperatura y oxigenación (Fig. 6.1).

Fig. 6.1. Instalaciones (tanques y fuentes de agua fría) donde se efectuaron las pruebas de patogenicidad de las bacterias.

El agua utilizada procedía de un pozo artesiano, se filtraba a través de un filtro de arena y tenía una temperatura relativamente constante (14-16 ºC). Las oscilaciones en la temperatura del agua se regularon mediante fuentes de agua fría (Castro Ibérica). El agua de desecho se desinfectó con un ozonificador Hydrozon K-40 (King Ozono).

6.3.2. Aislados bacterianos y preparación de los inóculos

Se utilizaron los 24 aislados bacterianos que manifestaron mayor inhibición in vitro frente a *Saprolegnia parasitica* (cuadro 5.3, pág 81).

Se prepararon suspensiones bacterianas siguiendo, en términos generales, el método descrito por Brunt y Austin (2005). Bacterias de cultivos en agar TSA de 3 días a 20 ºC se inocularon en frascos con 10 ml de TSB y se cultivaron toda la noche a 20 ºC. Después se centrifugaron a 1000 × *g* durante 10 min a 4 ºC y, tras eliminar el sobrenadante, las bacterias se resuspendieron en suero fisiológico estéril (0,9 % NaCl). Los recuentos se realizaron utilizando una cámara de Neubauer, ajustándose finalmente la suspensión bacteriana a una concentración de 10^7 bacterias ml^{-1}.

6.3.3. Inoculación de los peces y seguimiento de la infección

Las truchas se anestesiaron por inmersión en agua con 50 ppm de MS-222®. Seguidamente se inocularon 5 truchas por vía intramuscular y otras 5 por vía intraperitoneal (fig. 6.2), cada una con 0,1 ml (10^6 células) de la suspensión bacteriana descrita en el apartado anterior, colocándose cada grupo de truchas en tanques separados. Como testigos se utilizaron 10 truchas (5 por cada vía) que se inocularon con 0,1 ml de suero fisiológico estéril.

Fig. 6.2. Inoculación intraperitoneal en una trucha arcoíris.

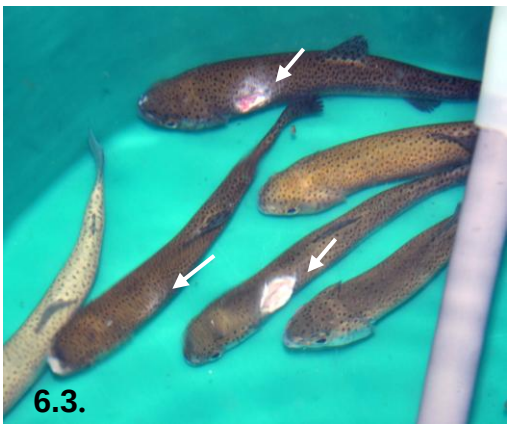
Durante los primeros seis días posinoculación se comprobó la calidad del agua midiendo diariamente la temperatura, oxígeno disuelto y pH en todos los tanques. La medición del oxígeno y del pH se realizó con un oxímetro de campo provisto de un electrodo de membrana sensible al oxígeno y una sonda para medición del pH (modelo HQ3d, Hach). Las características fisicoquímicas del agua durante los experimentos, expresadas como la media ± el error estándar, fueron las siguientes: oxígeno disuelto 7,5 ± 0,12 mg l^{-1} (entre 7 y 8 mg l^{-1}); pH 6,58 ± 0,38 (entre 6,1 y 7,2); y temperatura 13,2 ± 1,2 ºC (entre 12 y 15 ºC).

Se realizó un seguimiento de las truchas observándolas tres veces al día, durante 10 días, para detectar la presencia de signos de enfermedad y retirar las que habían muerto. Transcurridos 10 días desde la inoculación de las bacterias las truchas supervivientes se sacrificaron por inmersión en agua con 100 ppm de MS-222®. Tanto a las truchas muertas como a las sacrificadas se les realizó la necropsia y siembras en TSA de hígado, riñón, bazo y del tejido de la zona de inoculación intramuscular. Las placas se cultivaron a 20 ºC durante 3 días y las bacterias obtenidas se identificaron por la morfología de la colonia, pruebas bioquímicas y galerías API 20 E y API20NE (Biomerieux®), para ratificar que se trataba de la bacteria inoculada.

6.4. RESULTADOS

Dieciséis de los 24 aislados bacterianos fueron apatógenos para la trucha arcoíris ya que no provocaron mortalidad ni signos de enfermedad, y tampoco se reaisló la bacteria de los órganos internos de las truchas inoculadas. Estos aislados pertenecieron a las siguientes especies: *Aeromonas piscicola* (1), *Aeromonas sobria* (3), *Pantoea agglomerans* (3), *Pseudomonas fluorescens* (5), *Serratia fonticola* (1), *Xanthomonas retroflexus* (1) y *Yersinia kristensenii*

(2). De los aislados restantes, *Aeromonas salmonicida* (1), *Aeromonas sobria* (4) y *Aeromonas popoffii* (2), causaron una mortalidad del 20-50% a los diez días posinoculación mostrando algunas de las truchas importantes lesiones, siendo reaislada la bacteria de los órganos internos de las truchas; el otro aislado, *Aeromonas salmonicida* LE 9, no fue mortal pero causó lesiones (cuadro 6.1). Los dos aislados de *A. salmonicida* (LE 9 y LE 99) produjeron úlceras en el punto de inoculación intramuscular (fig. 6.3 y 6.4). Dos de los aislados de *A. sobria* (LE 17 y LE 104) y uno de *A. popoffii* (LE 65), provocaron lesiones en los órganos internos, principalmente en hígado y bazo (fig. 6.5 y 6.6).



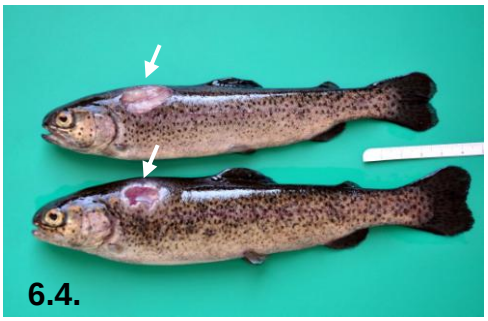


Fig. 6.3 y 6.4. Truchas arcoíris con úlceras cutáneas (flechas) producidas por *Aeromonas salmonicida* LE9 a los 10 días de la inoculación intramuscular.

Fig. 6.5. a) Trucha arcoíris con el hígado pálido y con el bazo hipertrofiado y con lesiones granulomatosas (flecha) a los 10 días de la inoculación intraperitoneal con *Aeromonas sobria* LE 104; b) Trucha testigo.

Fig. 6.6. Trucha arcoíris con el bazo hipertrofiado (flecha) a los 10 días de la inoculación intraperitoneal con *Aeromonas sobria* LE 17.

Cuadro 6.1. Resultados obtenidos con los 8 aislados bacterianos que fueron patógenos para la trucha arcoíris tras inocular 10^6 células por vía intramuscular (im) o vía intraperitoneal (ip).

Bacteria	Referencia	% de Mortalidad		% de truchas con lesiones	% de truchas con reaislamiento de la bacteria
		Im	Ip		
Aeromonas popoffii	LE 65	10	20	50 (20 m y 30 s)*	100 (30 m y 70 s)
Aeromonas popoffii	LE 69	0	20	0	20 (m)
Aeromonas salmonicida	LE 9	0	0	80 (s)	80 (s)
Aeromonas salmonicida	LE 99	50	0	50 (m)	50 (m)
Aeromonas sobria	LE 17	20	20	40 (30 m y 10 s)	50 (40 m y 10 s)
Aeromonas sobria	LE 68	0	30	0	30 (s)
Aeromonas sobria	LE 104	0	30	20 (s)	10 (m)
Aeromonas sobria	LE 100	0	30	0	30 (s)

* m: truchas muertas en el intervalo de los 10 días que duró el experimento; s: truchas sacrificadas a los 10 dias

6.5. DISCUSIÓN

Las bacterias que fueron patógenas para la trucha arcoíris pertenecieron al género *Aeromonas*. Los aislados de *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas salmonicida* y algunos de *Aeromonas sobria* causaron lesiones y mortalidad en los peces: *A. popoffii* y *A. sobria* produjeron lesiones en los órganos internos y *A. salmonicida* úlceras en el punto de la inoculación intramuscular. Algunas especies del género *Aeromonas* son bien conocidas como agentes patógenos de los peces. Respecto a las tres especies de *Aeromonas* citadas, se han descrito casos de enfermedad por aislados de *A. sobria* en *Dorosoma*

cepedianum y *Perca fluviatilis*; *A. salmonicida* causa la furunculosis y otros procesos en los peces (Austin y Austin, 2007); y *A. popoffii*, aunque desconocemos si ha sido citada como especie patógena, sí se ha descrito que tiene factores de virulencia (Soler y col. 2002). En el presente trabajo la inoculación de los peces con *A. salmonicida* se realizó cuando estos aislados estaban identificados como *Aeromonas* sp. y se desconocía cual era la especie, lo que es preciso especificar desde el punto de vista ético.

Otros aislados identificados como *Aeromonas sobria* y *Aeromonas piscicola* fueron inocuos. Ésta última especie ha mostrado tener cierta patogenicidad al haberse aislado de salmones del Atlántico y truchas arcoíris enfermas (Beaz-Hidalgo y col., 2009). En nuestro caso la identificación como *A. piscicola* también se realizó, al igual que con *A. salmonicida*, posteriormente a las pruebas de inoculación en las truchas; y además en inoculaciones realizadas más tarde se demostró que *A. piscicola* era patógena para la trucha arcoíris causando lesiones cutáneo-musculares similares a las provocadas por *Aeromonas salmonicida*.

Los restantes aislados bacterianos, en los que no se observó patogenicidad, pertenecieron a las especies *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens, Serratia fonticola*, *Xanthomonas retroflexus* y *Yersinia kristensenii*. De todas ellas, sí se han descrito aislados patógenos en las especies *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas fluorescens* (Bly y col., 1997; Austin y Austin, 2007); en los géneros *Yersinia* y *Serratia* hay algunas especies patógenas para los peces, como *Y. ruckeri*, *Y. intermedia*, *S. liquefaciens*, *S. marcescens* y *S. plymuthica*, pero no las probadas en el presente estudio.

Se ha demostrado la existencia de aislados bacterianos, pertenecientes a especies que causan enfermedad en peces, que son inocuos y que tienen utilidad probiotica frente a diversos agentes patógenos. Irianto y Austin (2002) lo comprobaron con aislados de *Vibrio fluvialis* y *Aeromonas hydrophila* frente a la furunculosis; y Brunt y Austin (2005) y Brunt y col. (2007) lo hicieron con un aislado de *Aeromonas sobria* utilizado para controlar diversas enfermedades, entre ellas la lactococosis y estreptococosis.

Los aislados bacterianos que tuvieron efecto inhibitorio in vitro frente a *Saprolegnia parasitica* y que en el presente capítulo se describen como apatógenos, se utilizarán en el próximo capítulo en los estudios sobre adhesión al moco cutáneo de trucha.

Capítulo 7

Adhesión de las bacterias al moco cutáneo de trucha común y antagonismo frente a la adhesión de *Saprolegnia parasitica*

7.1. INTRODUCCIÓN

La adhesión de las bacterias al moco cutáneo de la trucha, dificultando al mismo tiempo la unión de las zoosporas y quistes de *Saprolegnia parasitica*, es una propiedad que podría ser importante en la lucha biológica frente a la saprolegniosis. Por este motivo se realizaron ensayos in vitro con los aislados bacterianos que más inhibieron a *S. parasitica* y que se han descrito en los capítulos anteriores. Los objetivos fueron los siguientes:

1. Conocer el grado de adhesión de las bacterias al moco cutáneo de trucha.

2. Conocer si las bacterias reducen la adhesión de las zoosporas y quistes de *Saprolegnia parasitica* bajo condiciones de exclusión, competición y desplazamiento.

7.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los microorganismos beneficiosos pueden interferir con los patógenos obstaculizando su entrada mediante mecanismos como el bloqueo de los receptores de adhesión, la competición por los nutrientes o la producción de sustancias antimicrobianas (Nikoskelainen y col., 2001). La adhesión de las bacterias al moco intestinal o a las superficies externas del hospedador y su interacción con el agente patógeno para evitar o disminuir su adhesión, es una característica que hay que tener en cuenta (Ouwehand y col., 1999; Verschuere y col., 2000; Vine y col., 2004[a]; Chabrillón y col., 2005), ya que puede dar una idea del efecto que la bacteria va a ejercer in vivo sobre el agente patógeno. Por este motivo varios autores han estudiado la adhesión de las bacterias al moco de las mucosas de diversos hospedadores y su interacción con agentes patógenos bacterianos. Cohen y Laux (1995), Jin y col. (1996) y Ouwehand y col. (1999), investigaron la capacidad de diversas bacterias de adherirse al moco intestinal de pollos y humanos, entre otros hospedadores. También se ha estudiado la adhesión al moco intestinal, al cutáneo y al de las branquias de varias especies de peces (Nikoskelainen y col., 2001; Vine y col, 2004[b]; Chabrillón y col., 2005 y 2006; Balcázar y col.,

2007 y 2008; Sica y col., 2012). Sin embargo, todos estos trabajos tratan de la acción de las bacterias potencialmente probióticas frente a patógenos bacterianos, pero no existen estudios similares frente a *Saprolegnia parasitica*.

Para determinar la adhesión de las bacterias al moco intestinal, al cutáneo o al de las branquias se recurre al marcado de las bacterias, de modo que tras incubarlas en una placa de poliestireno con el moco se puede cuantificar las que permanecen unidas. Muchos autores recurren al marcado de las bacterias con isótopos radioactivos (Nikoskelainen y col., 2001; Vine y col, 2004[b]; Chabrillón y col., 2005 y 2006; Balcázar y col., 2007 y 2008); esta técnica es eficaz pero plantea inconvenientes y riesgos por tratarse de material radioactivo, lo que requiere del uso de equipos e instalaciones específicas. Van der Marel y col. (2008) desarrollaron una técnica basada en teñir las células bacterianas con el colorante fluorescente Syto 9, que utilizaron para estudiar la adhesión al moco intestinal de carpa de bacterias patógenas para los peces. Esta técnica es menos peligrosa que la utilización de isótopos radiactivos y también da buenos resultados. Namba y col. (2006) calcularon la adhesión de diversas bacterias al moco intestinal de carpa empleando un método basado en medir la densidad óptica de las bacterias que permanecían pegadas al mismo. Sica y col. (2012) realizaron ensayos para determinar la adhesión de las bacterias al moco cutáneo de trucha arcoíris utilizando portaobjetos y efectuando el recuento de las bacterias unidas al moco tras su tinción con el método Gram.

7.3. MATERIAL Y MÉTODOS

7.3.1. Aislados bacterianos y de *Saprolegnia parasitica*

Se utilizaron los 15 aislados bacterianos que fueron más inhibitorios in vitro frente a *Saprolegnia parasitica* y que a su vez resultaron apatógenos para la trucha arcoíris (cuadro 7.1). El aislado de *S. parasitica* (TRU8) fue el mismo que se empleó en los ensayos descritos en los capítulos anteriores.

Cuadro 7.1. Aislados bacterianos utilizados para las pruebas de adhesión al moco cutáneo de trucha común.

Bacteria	Referencia
Aeromonas sobria	LE 51
Aeromonas sobria	LE 74
Aeromonas sobria	LE 76
Pantoea agglomerans	LE 35
Pantoea agglomerans	LE 36
Pantoea agglomerans	LE 37
Pseudomonas fluorescens	LE 89
Pseudomonas fluorescens	LE 98
Pseudomonas fluorescens	LE 122
Pseudomonas fluorescens	LE 141
Pseudomonas fluorescens	LE 143
Serratia fonticola	LE 52
Xanthomonas retroflexus	LE 38
Yersinia kristensenii	LE 54
Yersinia kristensenii	LE 58

7.3.2. Obtención del moco cutáneo

El moco cutáneo se recogió de machos y hembras de trucha común (*Salmo trutta* L.) procedentes del Centro Piscícola de Vegas del Condado. Se utilizaron 4 truchas de cada sexo para preparar dos lotes de moco independientes. Los peces, con peso de 138,6 ± 76,5 g, se transportaron vivos en bolsas de plástico con agua del estanque (ver apartado 3.2.2) y una vez en el laboratorio se sacrificaron por contusión en la cabeza. El moco cutáneo se obtuvo raspando toda la superficie corporal con una espátula de plástico sobre una placa de Petri. A continuación se añadió una pequeña cantidad de PBS para facilitar la recogida del moco, que seguidamente se centrifugó dos veces a 12 000 × *g* durante 5 min a 4 ºC para eliminar las células y partículas en suspensión. La concentración de proteínas del moco, que se calculó mediante el método de Bradford utilizando albúmina sérica bovina (ASB, Sigma) para elaborar la curva patrón, se ajustó a 0,5 mg ml^{-1} en PBS. Finalmente la suspensión de moco se esterilizó mediante exposición a luz ultravioleta durante 30 min y se conservó a −20 ºC en alícuotas de 1 ml hasta su utilización.

7.3.3. Adhesión del moco cutáneo a la placa de poliestireno

Para comprobar la adhesión del moco cutáneo de trucha a la placa de poliestireno se realizó un ELISA indirecto, basado en la unión de una lectina (dolichos biflorus lectin) a las glicoproteínas del moco, según el método descrito por Neuhaus y col. (2007). Este se llevó a cabo en placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar®, Corning Incorporated), que fueron tapizadas añadiendo a cada pocillo 25 µl del moco cutáneo, bien de macho o de hembra, por triplicado y en diluciones seriadas 1/10 a partir de la solución inicial del moco. Como testigos positivo y negativo se utilizó moco gástrico de cerdo (mucin from porcine stomach, Type II; 0,05 mg ml^{-1}, Sigma) y albúmina sérica bovina (0,05 mg ml^{-1}, Sigma), respectivamente. Después se añadió a cada pocillo 75 µl de tampón de tapizado (16,8 g de bicarbonato sódico, 21,2 g de carbonato sódico por litro; pH 9,6) y se dejó incubar la placa 12 h a 4 ºC. Seguidamente se efectuaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0,05% y se bloqueó añadiendo a cada pocillo 150 µl de PBS-Albúmina Sérica Bovina al 1% (PBS-BSA), durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron otros tres lavados y se añadieron 100 µl de la lectina dolichos biflorus lectin (DBA, Sigma) conjugada con biotina (Sigma) diluida 1/1000 en PBS, incubando 1 h a temperatura ambiente. Tras otros 3 lavados se añadió a cada pocillo 100 µl de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Sigma) diluida 1/2000 en PBS, incubαndose durante 30 min a temperatura ambiente. Despuıs de un nuevo ciclo de lavado se apadieron 100 µl de solución cromógena (OPD Tablets, DakoCytomation) con un 0,04% de H_2O_2 al 30% y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se frenó la reacción con 100 µl de H_2SO_4 0,5 M y se leyó la densidad óptica (DO) con una longitud de onda de 492 nm en un lector Titertek Multiscan. Todas las incubaciones se realizaron con las placas selladas.

7.3.4. Adhesión de las bacterias y de los quistes de *Saprolegnia parasitica* al moco cutáneo de trucha

7.3.4.1. Tinción de las bacterias y de los quistes de *S. parasitica*

Las bacterias se incubaron durante 3 días a 20 ºC en TSA, realizándose recuentos para ajustar su concentración a 10^9 bacterias ml^{-1} en TSB. Esta solución bacteriana se distribuyó en alícuotas de 1 ml y se conservó a −80 ºC hasta su uso, según el método descrito por Schroers y col. (2008). Se realizaron recuentos en placa, previamente a la realización de las pruebas de adhesión, para comprobar el porcentaje de supervivencia de las bacterias.

Las alícuotas de las bacterias conservadas a −80 ºC se descongelaron y se centrifugaron a 10 500 × *g* durante 10 min a 4 ºC para eliminar el medio de cultivo. Tras ser resuspendidas en 1 ml de suero fisiológico estéril (0,9 % NaCl) se añadió el colorante fluorescente para ácidos nucleicos Syto® 9 (Invitrogen), en una proporción de 1 µl para las 10^9 bacterias. Después la suspensión bacteriana se centrifugó a 10 500 × *g* durante 10 min a 4 ºC y, tras eliminar el sobrenadante, las bacterias fueron resuspendidas en 1 ml de suero fisiológico estéril. Esta suspensión se analizó espectrofotométricamente en un lector Genios (Tecon) con filtro de fluorescencia (485 nm de excitación y 535 nm de emisión) y se comprobó la correcta tinción y la motilidad de las bacterias al microscopio (Nikon Optiphot 2 con un filtro B2A) (fig. 7.1).

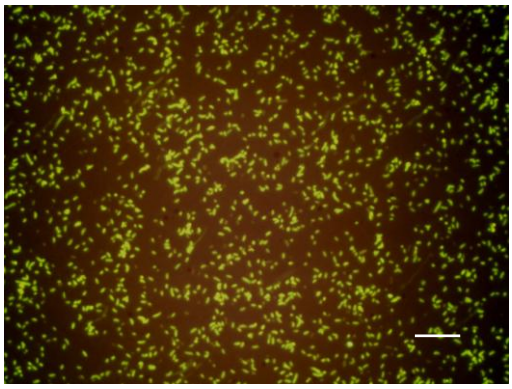


Fig. 7.1. *Aeromonas sobria* teñida con Syto® 9 (escala: 10 µm).

Las zoosporas de *Saprolegnia parasitica* se obtuvieron como se describió en el apartado 5.3.1.4. La suspensión de zoosporas, procedente de 5 placas de Petri con 20 ml de agua RFE, se centrifugó a 18 514 × *g* durante 20 min y seguidamente se resuspendió en suero fisiológico añadiendo el Syto® 9 a una concentración de 1 µl de colorante por cada 10^5 quistes en 1 ml. La suspensión de quistes se volvió a centrifugar

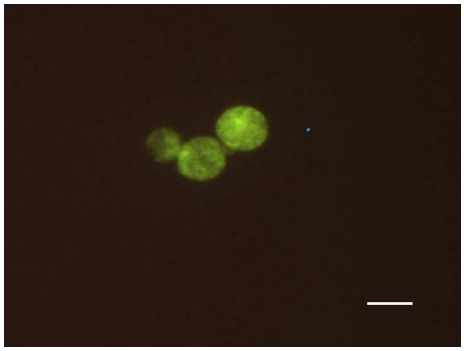


Fig. 7.2. Quistes secundarios de *Saprolegnia parasitica* teñidos con Syto® 9 (escala: 10 µm).

(18 514 × *g*, 20 min) para eliminar el colorante restante y a continuación se resuspendieron en 1 ml de suero fisiológico. Los quistes fueron analizados espectrofotométricamente y se comprobó si estaban correctamente teñidos al igual que se hizo con las bacterias (fig. 7.2).

7.3.4.2. Pruebas de adhesión al moco

Para realizar los ensayos de adhesión se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos de color negro (Costar®, Corning Incorporated) (fig. 7.3) que se tapizaron con 25 µl de la solución de moco cutáneo diluida al 1/10, con lo que la concentración final de proteínas fue de 0,05 mg ml^{-1}. Las soluciones de moco, tanto de macho como de hembra, se probaron por triplicado. La adhesión inespecífica se comprobó tapizando pocillos con moco gástrico de cerdo (mucin from porcine stomach, Type II; 0,05 mg ml^{-1}, Sigma) y albúmina sérica bovina (ASB, 0,05 mg ml^{-1}, Sigma). Después se añadieron a cada pocillo 75 µl de tampón de tapizado (ver apartado 7.3.3) dejando incubar las placas toda la noche a 4 ºC. Tras realizar 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0,05%, se añadieron 25 µl de la suspensión de 10^9 bacterias ml^{-1} teñidas con Syto 9. Esta suspensión fue forzada hacia el fondo de los pocillos mediante centrifugado de las placas (163 × *g*, 12 s) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad con las placas selladas. Después se realizó la lectura de la fluorescencia generada por las bacterias añadidas a los pocillos utilizando como blanco suero fisiológico estéril. Se consideró que esta fue la lectura a tiempo 0 (T0). Los pocillos se lavaron con suero fisiológico, eliminando los restos de líquido mediante el centrifugado de las placas boca abajo sobre papel secante (163 × *g*, 12 s). Tras el lavado se realizó una segunda lectura de la fluorescencia (añadiendo previamente 50 µl de suero fisiológico en cada

pocillo) y la adherencia se expresó como el porcentaje de fluorescencia de las bacterias en esta segunda lectura respecto a la registrada a T0.

Para las pruebas de adhesión con quistes se utilizaron las mismas placas de 96 pocillos de color negro tapizadas con moco cutáneo de macho y de hembra de trucha común, por triplicado, del mismo modo que en las pruebas con bacterias, y se siguieron los mismos pasos pero sustituyendo la solución bacteriana por la de 10^5 quistes ml^{-1}. La adherencia se expresó igual que en los ensayos con bacterias.

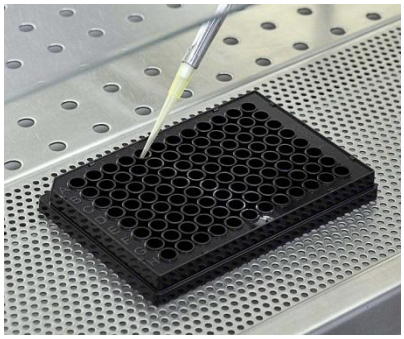


Fig 7.3. Placas de poliestireno de 96 pocillos utilizadas en los ensayos de adhesión de las bacterias y de los quistes de *Saprolegnia parasitica* al moco cutáneo de trucha.

7.3.5. Antagonismo de las bacterias frente a la adhesión de los quistes de *Saprolegnia parasitica* al moco cutáneo de trucha

7.3.5.1. Preparación de los quistes y de las bacterias

Los quistes de *Saprolegnia parasitica*, a una concentración de 10^5 quistes ml^{-1}, se tiñeron como se ha descrito en el apartado 7.3.4.1.

Las alícuotas de las suspensiones bacterianas (ver apartado 7.3.4.1) se descongelaron y centrifugaron a 10 500 × *g* durante 10 min para eliminar el medio de cultivo. Después se resuspendieron en 1 ml de suero fisiológico estéril y, utilizando esta suspensión bacteriana como la dilución inicial, se realizaron otras 5 diluciones seriadas 1/10.

7.3.5.2. Pruebas de exclusión, competición y desplazamiento

Se investigó si la bacteria potencialmente beneficiosa era capaz de influir negativamente en la adhesión del agente patógeno al moco cutáneo de trucha. En este sentido se estudió la “exclusión” del agente patógeno (primero se

añadió la bacteria y después *Saprolegnia parasitica*), la “competición” con el agente patógeno (la bacteria y *S. parasitica* se añadieron al mismo tiempo) y el “desplazamiento” del agente patógeno (primero se añadió *S. parasitica* y después la bacteria). El porcentaje de reducción de la adhesión se cuantificó comparando con el testigo en el que no se añadió la bacteria.

Las pruebas se realizaron en las placas de poliestireno de 96 pocillos de color negro mencionadas anteriormente. Los pocillos se tapizaron con moco cutáneo de trucha macho tal como se ha descrito en los apartados anteriores. Se optó por el moco de macho ya que se observó una mejor adhesión que con el moco de hembra y porque los machos presentan una mayor incidencia de saprolegniosis (Richards y Pickering, 1979; Aller Gancedo y Fernández Díez, 1987). Todas los ensayos se realizaron por triplicado. Para las pruebas de exclusión se añadieron 25 µl de cada dilución de las bacterias que se forzaron hacia el fondo mediante centrifugado de las placas (163 × *g*, 12 s). Tras incubar 30 min a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron con suero fisiológico, se añadieron 25 µl de la solución de quistes teñidos, se centrifugaron de nuevo las placas (163 × *g*, 12 s) y se dejaron incubar otros 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Para las pruebas de competición se añadieron simultáneamente a cada pocillo 25 µl de la suspensión de quistes teñidos y 25 µl de cada dilución de bacterias, forzándolos hacia el fondo mediante centrifugado (163 × *g*, 12 s). Las placas se dejaron incubar durante 60 min a temperatura ambiente en oscuridad. Para las pruebas de desplazamiento se añadieron a los pocillos 25 µl de la suspensión de quistes teñidos y tras su centrifugado para forzarlos al fondo (163 × *g*, 12 s) se dejaron incubar durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Después del lavado de los pocillos se añadieron 25 µl de la suspensión bacteriana, se centrifugaron de nuevo las placas (163 × *g*, 12 s) y se dejaron incubar otros 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Tras los 60 minutos totales de incubación, en las tres pruebas, se realizó un lavado para eliminar los quistes no adheridos al moco y se leyó la fluorescencia (después de añadir 50 µl de suero fisiológico en cada pocillo) utilizando como blanco suero fisiológico. Para los tres tipos de ensayo se prepararon testigos consistentes en añadir suero fisiológico en lugar de la suspensión de bacterias. El porcentaje de adhesión de los quistes en

presencia de bacterias fue comparado con el valor de referencia (considerado el 100%) de los testigos. Todas las incubaciones se realizaron con las placas selladas.

7.3.6. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. Las diferencias en la adhesión de las bacterias a los diferentes sustratos fueron examinadas mediante la prueba *t* de Student y la prueba *t* de Student pareada. También se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para determinar la posible relación entre la adhesión de las bacterias al poliestireno y al moco cutáneo de trucha macho.

Para las pruebas de exclusión, competición y desplazamiento se utilizó el estadístico *t* de Student para determinar si las diferencias en la adhesión de los quistes eran estadísticamente significativas al comparar la presencia de bacterias con los testigos. En todos los casos los valores $P<0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Los diferentes cálculos estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS versión 16.0 y Microsoft Excel 2003.

7.4. RESULTADOS

7.4.1. Adhesión del moco cutáneo de trucha a las placas de poliestireno

La prueba de ELISA evidenció que el moco cutáneo de trucha se adhiere a las placas de poliestireno. Los pocillos tapizados con el moco de trucha macho y con el de hembra, presentaban una densidad óptica de 2,56 ± 0,11 y 2,63 ± 0,12, respectivamente, muy superior que en los tapizados con albúmina sérica bovina (0,87 ± 0,03) lo que, de acuerdo con Neuhaus y col. (2007), demostró la unión de la lectina DBA a las glicoproteínas del moco, concretamente a la alfa-galactosamina de la cadena glucídica. En los pocillos tapizados con moco gástrico de cerdo, que era el testigo positivo, la densidad óptica fue de 3,81 ± 0,16 (fig 7.4).

Fig 7.4. Prueba de ELISA para determinar la adhesión del moco cutáneo de trucha común a una placa de poliestireno. Filas A y B: moco cutáneo de truchas macho y hembra, respectivamente. Fila C: testigo positivo (moco gástrico de cerdo). Fila D: testigo negativo (albúmina sérica bovina).

7.4.2. Adhesión de las bacterias al moco cutáneo

Los resultados de estas pruebas se muestran en el cuadro 7.2. La adhesión de las 15 bacterias al moco cutáneo de trucha común macho fue en general baja, estando comprendida entre 1,7% (*Aeromonas sobria* LE 76) y 15,3% (*Pseudomonas fluorescens* LE 141). La adhesión de las bacterias al moco de macho fue mayor que la adhesión al moco de hembra, siendo las diferencias significativas (*t* pareada, P<0,003). Sin embargo, esta adhesión al moco cutáneo de macho fue similar a la que presentaron las bacterias a la albúmina sérica bovina y al moco gástrico de cerdo (*t* pareada, P>0,05), siendo las diferencias significativas sólo en 5 aislados entre la adhesión al moco cutáneo de macho y a la albúmina sérica bovina, y en otros 5 aislados entre el moco cutáneo de macho y el moco gástrico de cerdo (*t* de Student, P<0,05). Además, en 2 aislados la adhesión al moco gástrico de cerdo fue significativamente superior a la adhesión al moco de trucha macho (*t* de Student, P<0,05).

La adhesión de las bacterias al poliestireno fue similar a la observada al moco cutáneo de macho. Sólo hubo diferencias significativas con *Aeromonas sobria* LE 51 que tuvo una menor adhesión al poliestireno que al moco de macho, y con *Pseudomonas fluorescens* LE 141 en la que la adhesión fue menor al poliestireno que a ambos tipos de moco (*t* de Student, P<0,05). A su vez 7 bacterias tuvieron una mayor adhesión al poliestireno que al moco de macho, pero no hubo diferencias significativas (*t* de Student, P>0,05). Existió una correlación estadísticamente significativa entre la adhesión de las bacterias al poliestireno y al moco cutáneo de trucha macho (coeficiente de correlación de Pearson, r= 0,7408; P=0,0014, una cola).

Cuadro 7.2. Porcentaje de adhesión (media ± DE de tres experimentos) de 15 aislados bacterianos al moco cutáneo de trucha común macho (MCM), al de trucha común hembra (MCH), a la albúmina sérica bovina (ASB), al moco gástrico de cerdo (MGC) y al poliestireno.

Bacteria	Referencia	% de adhesión bacteriana				
		MCM	MCH	ASB	MGC	Poliestireno
Aeromonas sobria	LE 51	2,02 ± 1,22	1,63 ± 0,20	**1,19 ± 1,55** *	6,82 ± 0,98	**1,74 ± 0,02** *
Aeromonas sobria	LE 74	3,48 ± 0,36	2,82 ± 0,61	2,48 ± 0,13	2,99 ± 0,10	2,65 ± 0,32
Aeromonas sobria	LE 76	1,66 ± 0,55	1,36 ± 2,04	1,61 ± 0,27	8,55 ± 0,11	1,45 ± 0,12
Pantoea agglomerans	LE 35	9,99 ± 0,92	7,55 ± 2,32	9,86 ± 0,09	7,98 ± 0,12	11,35 ± 0,06
Pantoea agglomerans	LE 36	4,59 ± 0,17	3,65 ± 0,52	**3,59 ± 0,16** *	**3,32 ± 0,04** *	3,92 ± 0,22
Pantoea agglomerans	LE 37	2,28 ± 0,19	2,07 ± 0,25	**1,58 ± 0,15** *	**1,51 ± 0,47** *	2,51 ± 0,13
Pseudomonas fluorescens	LE 89	2,89 ± 0,19	3,01 ± 0,71	2,80 ± 1,37	2,56 ± 1,05	3,62 ± 0,11
Pseudomonas fluorescens	LE 98	2,95 ± 1,06	2,56 ± 0,39	3,66 ± 0,36	2,75 ± 0,18	3,14 ± 0,02
Pseudomonas fluorescens	LE 122	3,99 ± 0,54	2,59 ± 0,37	**2,82 ± 0,33** *	**2,79 ± 0,25** *	3,83 ± 0,08
Pseudomonas fluorescens	LE 141	15,27 ± 1,06	13,26 ± 0,23	**6,87 ± 0,44** *	**9,21 ± 0,42** *	**6,77 ± 0,29** *
Pseudomonas fluorescens	LE 143	3,01 ± 0,67	1,99 ± 0,43	2,13 ± 0,19	1,9 ± 0,17	1,59 ± 0,01
Serratia fonticola	LE 52	4,15 ± 0,96	3,43 ± 0,25	4,86 ± 0,24	3,99 ± 0,37	4,51 ± 0,22
Xanthomonas retroflexus	LE 38	3,01 ± 0,55	2,27 ± 0,40	1,83 ± 0,13	2,19 ± 0,59	2,68 ± 0,02
Yersinia kristensenii	LE 54	4,71 ± 0,53	3,43 ± 1,12	3,6 ± 0,09	2,79 ± 0,50	4,89 ± 0,09
Yersinia kristensenii	LE 58	3.47 ± 1,04	2.84 ± 1,04	2.72 ± 0,73	**2.15 ± 0,00** *	4.17 ± 0,52

* Indica la existencia de una diferencia significativa ($P<0,05$) entre la mayor adhesión de la bacteria al MCM que a la ASB; al MCM que al MGC; y al MCM que al poliestireno.

7.4.3. Adhesión de los quistes de *Saprolegnia parasitica* al moco cutáneo de trucha

La adhesión de los quistes al moco cutáneo de trucha macho fue elevada (88,9 ± 6,8%) y mayor que al moco de hembra (75,5 ± 7,5%), pero las diferencias no fueron significativas (*t* de Student, P>0,05). La adhesión de los quistes al moco de macho y al resto de sustratos tampoco fue significativamente diferente (*t* de Student, P >0,05) (fig. 7.5).

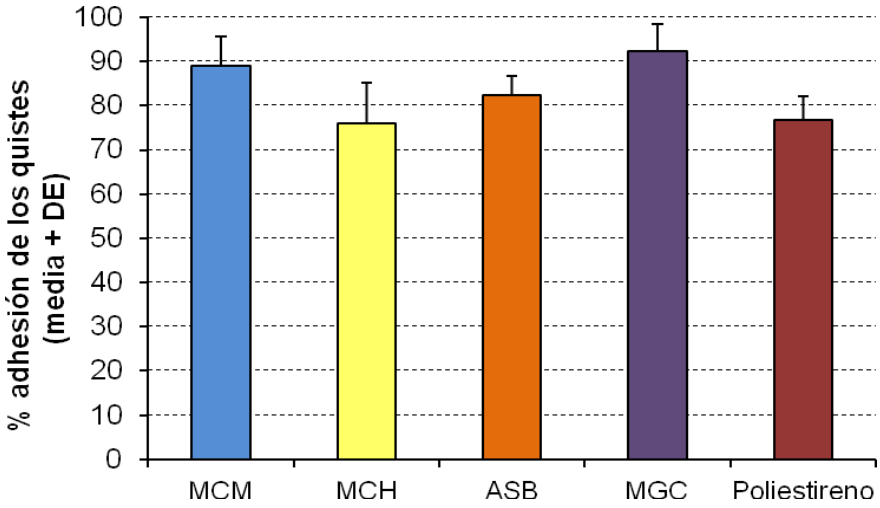


Fig. 7.5. Porcentaje de adhesión (media + DE de tres experimentos) de los quistes de *Saprolegnia parasitica* al moco cutáneo de trucha común macho (MCM), al moco cutáneo de trucha común hembra (MCH), a la albúmina sérica bovina (ASB), al moco gástrico de cerdo (MGC) y al poliestireno.

7.4.4. Pruebas de exclusión, competición y desplazamiento de *Saprolegnia parasitica* con bacterias

Los resultados de estas pruebas se muestran en el cuadro 7.3. En condiciones de exclusión (cuando se añadió primero la bacteria y después los quistes de *Saprolegnia parasitica*), la adhesión de los quistes al moco cutáneo de trucha común macho fue reducida significativamente (*t* de Student, P<0,05) por 13 de los 15 aislados bacterianos probados, pero con diferente número de bacterias. Así, 4 de los aislados bacterianos lo hicieron hasta la tercera dilución ($2,5 \times 10^7$ bacterias), 4 hasta la cuarta ($2,6 \times 10^6$ bacterias), 3 hasta la quinta ($2,5 \times 10^5$ bacterias) y 2 hasta la sexta ($2,5 \times 10^4$ bacterias). Estos últimos aislados eran *Pseudomonas fluorescens* (LE 141) y *Aeromonas sobria* (LE 76).

Los porcentajes de reducción de la adhesión de los quistes de *S. parasitica* con las concentraciones efectivas de bacterias estuvieron comprendidos entre 78,25 y 8,5%.

En las pruebas de competición (bacteria y quistes se añadieron al mismo tiempo) la adhesión de los quistes fue reducida significativamente por los 15 aislados bacterianos probados (*t* de Student, $P<0,05$), también con diferentes cantidades de bacterias. Uno de los aislados bacterianos disminuyó esta adhesión de forma significativa hasta la tercera dilución ($2,5 \times 10^7$ bacterias), 7 lo hicieron hasta la cuarta ($2,5 \times 10^6$ bacterias), 5 hasta la quinta ($2,5 \times 10^5$ bacterias) y 2 hasta la sexta ($2,5 \times 10^4$ bacterias). Estos últimos aislados eran de *Aeromonas sobria* (LE 74 y LE 76). Los porcentajes de reducción en la adhesión de los quistes de *Saprolegnia parasitica* con las concentraciones efectivas de bacterias oscilaron entre 88,03 y 7,42%.

En las pruebas de desplazamiento (se añadieron primero los quistes y después la bacteria), 8 de los 15 aislados probados fueron capaces de reducir significativamente la adhesión de los quistes al moco cutáneo. De ellos, 6 lo hicieron hasta la tercera dilución ($2,5 \times 10^7$ bacterias) y 2 hasta la cuarta ($2,5 \times 10^6$ bacterias). Estos dos últimos aislados fueron de nuevo *Aeromonas sobria* LE 74 y LE 76. Los porcentajes de reducción de la adhesión de los quistes de *Saprolegnia parasitica* con las concentraciones efectivas de bacterias estuvieron comprendidos entre 28,16 y 5,24%.

Cuadro 7.3. Porcentaje de reducción de la adhesión de los quistes de *Saprolegnia parasitica* al moco cutáneo de trucha común macho en presencia de diferente número de células de 15 aislados bacterianos, bajo condiciones de exclusión, competición y desplazamiento.

Bacteria	Referencia	Número de células bacterianas	% de reducción de la adhesión de los quistes		
			Exclusión	Competición	Desplazamiento
Aeromonas sobria	LE 51	$2,5 \times 10^7$	65,66	84,07	**9,63** *
		$2,5 \times 10^6$	31,81	79,35	8,07
		$2,5 \times 10^5$	**14,12** *	**61,13** *	0,86
Aeromonas sobria	LE 74	$2,5 \times 10^7$	64,15	83,61	20,45
		$2,5 \times 10^6$	35,06	77,34	**16,05** *
		$2,5 \times 10^5$	**16,44** *	73,61	8,62
		$2,5 \times 10^4$	4,25	**36,13** *	0
Aeromonas sobria	LE 76	$2,5 \times 10^7$	78,25	88,03	28,16
		$2,5 \times 10^6$	61,46	81,07	**21,17** *
		$2,5 \times 10^5$	34,84	81,88	15,79
		$2,5 \times 10^4$	**13,74** *	**72,83** *	9,36
Pantoea agglomerans	LE 35	$2,5 \times 10^7$	5,98	69,86	13,94
		$2,5 \times 10^6$	3,67	32,94	8,78
		$2,5 \times 10^5$	2	**7,42** *	8,40
Pantoea agglomerans	LE 36	$2,5 \times 10^7$	**13,91** *	60,97	**8,47** *
		$2,5 \times 10^6$	0	**55,67** *	0
Pantoea agglomerans	LE 37	$2,5 \times 10^7$	8,80	63,55	6,17
		$2,5 \times 10^6$	3,75	**57,30** *	3,53
Pseudomonas fluorescens	LE 89	$2,5 \times 10^7$	35,53	77,87	**20,24** *
		$2,5 \times 10^6$	15,76	**56,15** *	9,98
		$2,5 \times 10^5$	**10,21** *	13,85	10,30
Pseudomonas fluorescens	LE 98	$2,5 \times 10^7$	10,64	**73,66** *	5,00
		$2,5 \times 10^6$	**10,63** *	48,96	0,34
Pseudomonas fluorescens	LE 122	$2,5 \times 10^7$	51,90	42,94	**5,24** *
		$2,5 \times 10^6$	**31,79** *	**37,56** *	0
Pseudomonas fluorescens	LE 141	$2,5 \times 10^7$	42,08	83,80	13,83
		$2,5 \times 10^6$	37,93	72,37	8,68
		$2,5 \times 10^5$	36,17	**32,23** *	0
		$2,5 \times 10^4$	**10,27** *	7,78	6,09
Pseudomonas fluorescens	LE 143	$2,5 \times 10^7$	32,67	75,67	0,87
		$2,5 \times 10^6$	**14,05** *	63,55	0
		$2,5 \times 10^5$	6,41	**36,14** *	0
Serratia fonticola	LE 52	$2,5 \times 10^7$	**8,50** *	56,71	7,46
		$2,5 \times 10^6$	4,61	**39,64** *	0
Xanthomonas retroflexus	LE 38	$2,5 \times 10^7$	**19,72** *	83,35	**10,97** *
		$2,5 \times 10^6$	7,71	74,51	10,27
		$2,5 \times 10^5$	12,48	**44,18** *	7,76
Yersinia kristensenii	LE 54	$2,5 \times 10^7$	20,13	52,59	**9,37** *
		$2,5 \times 10^6$	**13,56** *	**49,78** *	5,92
Yersinia kristensenii	LE 58	$2,5 \times 10^7$	**15,00** *	50,68	4,89
		$2,5 \times 10^6$	5,60	**36,06** *	0

***** Indica el porcentaje de reducción de la adhesión de los quistes de *S. parasitica* (alcanzado por el menor número de bacterias) que es significativo en comparación con el testigo (sin bacterias).

En la fig. 7.6 se representan los porcentajes de reducción de la adhesión de los quistes de *Saprolegnia parasitica* obtenidos por los 4 mejores de los 15 aislados bacterianos, teniendo en cuenta las tres pruebas de exclusión, competición y desplazamiento.

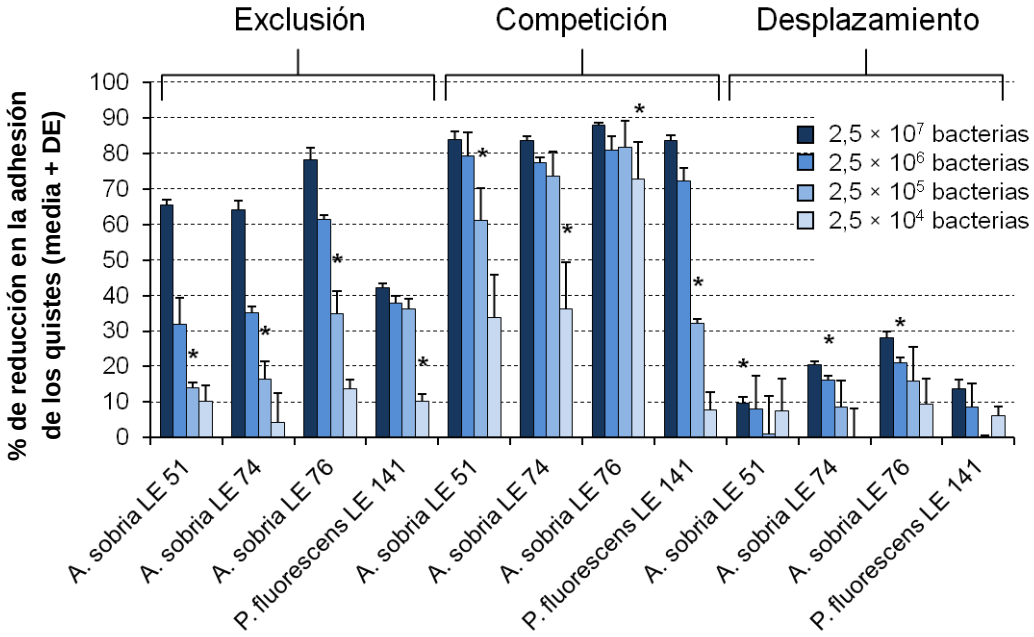


Fig. 7.6. Porcentaje de reducción de la adhesión de los quistes de *Saprolegnia parasitica* al moco cutáneo de trucha común macho (media + DE de tres experimentos), en presencia de los 4 aislados bacterianos que fueron eficaces en al menos dos de las tres condiciones probadas (exclusión, competición y desplazamiento); los resultados se expresan comparando con la adhesión de los quistes en los testigos (sin bacterias). * Indica el número mínimo de bacterias que redujo significativamente la adhesión de los quistes de *S. parasitica*.

7.5. DISCUSIÓN

Como se ha comentado anteriormente, la adhesión de la bacteria al moco del hospedador, y su capacidad para reducir la adhesión del agente patógeno, es una característica deseable en una bacteria que se pretenda utilizar en la lucha biológica frente a la enfermedad (Chabrillón y col., 2005).

En el presente estudio se han encontrado porcentajes bajos de adhesión de las diversas bacterias al moco cutáneo de trucha común, no sobrepasando el 15,3%. El aislado bacteriano con mayor capacidad de adhesión fue *Pseudomonas fluorescens* LE 141, seguido por *Pantoea agglomerans* LE 35. La baja capacidad de las bacterias para unirse al moco de peces está en

concordancia con los resultados obtenidos por otros autores (Chabrillón y col., 2005 y 2006; Balcázar y col., 2007), y especialmente con los obtenidos empleando moco cutáneo, ya que se ha observado en algunos casos una menor adhesión de las bacterias al moco cutáneo que al moco intestinal en trucha arcoíris y otras especies de peces (Chabrillón y col., 2006; Balcázar y col., 2007 y 2008).

Se comprobó una mayor adhesión de las bacterias al moco de macho que al de hembra, lo que quizá podría influir en el tratamiento en el supuesto de que se llegasen a utilizar estas bacterias en el control biológico de la saprolegniosis, por lo habría que comprobar si dicha diferencia en la adhesión al moco requeriría una mayor concentración de bacterias en el tratamiento de las truchas hembra.

La unión inespecífica se puede valorar probando la adhesión de las bacterias a la albúmina sérica bovina pues, como afirmaron Ouwehand y col. (2003), es improbable que éstas hayan desarrollado una afinidad específica por dicho sustrato. En este estudio las bacterias se adhirieron en porcentajes similares a la albúmina sérica bovina y al moco de trucha común macho. Balcázar y col. (2007 y 2008) encontraron mayor adhesión de las bacterias al moco intestinal de trucha arcoíris que a la albúmina sérica bovina, pero con el moco cutáneo no existieron estas diferencias. Sin embargo, en otro estudio la unión de las bacterias al moco intestinal y cutáneo de trucha arcoíris sí fue significativamente mayor que a la albúmina sérica bovina y también a la gelatina en la mayoría de aislados bacterianos probados (Nikoskelainen y col., 2001).

La adhesión de las bacterias al moco gástrico de cerdo fue en general menor que al moco cutáneo de trucha, pero no hubo diferencias significativas. Estos resultados sugieren que la adhesión al moco no se debe a uniones específicas, dependiendo más del aislado bacteriano que se prueba que del moco utilizado. La ausencia de especificidad de hospedador para la adhesión también fue encontrada por otros autores (Nikoskelainen y col., 2001; Rinkinen y col., 2003; Chabrillón y col., 2005 y 2006). Sin embargo, es una característica

deseable y por tanto recomendada como un criterio de selección de los posibles probióticos (Rinkinen y col., 2003; Chabrillón y col., 2005).

La adhesión al poliestireno fue casi tan elevada como la observada en el moco cutáneo de trucha común macho, lo que está en concordancia con otros autores (Nikoskelainen y col., 2001; Balcázar y col., 2007). La alta adhesión de las bacterias al poliestireno se ha relacionado con interaciones hidrofóbicas (Balcázar y col., 2007 y 2008). Asimismo, la elevada hidrofobicidad de las bacterias ha sido considerada un indicador de buena capacidad de adhesión por algunos autores (Wadstroum y col., 1987; Balcázar y col., 2007; Pérez-Sánchez y col., 2011), habiéndose encontrado en el presente estudio una correlación entre la elevada adhesión al moco cutáneo de trucha macho y la adhesión al poliestireno, al contrario que Balcázar y col. (2007). Sin embargo, Ouwehand y col. (1999) afirmaron que no existía relación entre la elevada hidrofobicidad de las bacterias y su buena capacidad adhesiva. Otro indicador de buena capacidad de adhesión es la autoagregación (Collado y col., 2008).

En el presente capítulo se describe un nuevo método para estudiar tanto la adhesión de los quistes de *Saprolegnia parasitica* al moco cutáneo de trucha como la capacidad de las bacterias de reducirla bajo diferentes condiciones, basado en teñir los quistes con el colorante fluorescente Syto 9, lo que es más sencillo y de menor riesgo para el investigador que el uso de isótopos radioactivos. El elevado porcentaje en que los quistes secundarios de *S. parasitica* se adhieren al moco cutáneo de trucha podría deberse a que poseen haces de filamentos con ganchos, que han sido considerados una adaptación de las cepas más patógenas para permitir la unión de los quistes al hospedador (Pickering y Willoughby, 1982; Beakes, 1983). Sin embargo, no hemos observado diferencias significativas entre la adhesión de diversos aislados de *S. parasitica* y *Saprolegnia diclina* al moco cutáneo (datos sin publicar), por lo que otros factores como las glicoproteínas que rodean los filamentos podrían tener un papel importante en la fijación al pez (Burr y Beakes, 1994). La adhesión de los quistes fue mayor al moco cutáneo de trucha macho que al de hembra. Este hecho podría tener relación con la mayor incidencia de saprolegniosis en truchas macho encontrada por otros autores (Aller-Gancedo y Fernández-Díez, 1987). Al mismo tiempo, la menor cantidad de moco en la

piel de los machos de trucha común, que Pickering (1977) asoció con niveles de andrógenos plasmáticos más elevados, podría reducir la protección de la piel y contribuir también a la mayor predisposición de los machos a ser infectados tal como sugirió este autor.

La capacidad de las bacterias de disminuir la adhesión de los quistes varió según las condiciones del experimento. Así, en las pruebas de exclusión casi todas las bacterias excluyeron a los quistes de *Saprolegnia parasitica*, pero con diferentes cantidades de células. Lo mismo sucedió con todos los aislados bacterianos en las pruebas de competición. En cambio, sólo la mitad de las bacterias consiguieron desplazar a los quistes del moco cutáneo, y además se necesitaron concentraciones más altas que en la exclusión y competición; esto podría ser debido a la alta capacidad de adhesión de los quistes de *S. parasitica*, lo que haría difícil eliminarlos del moco una vez que ya están unidos. Otros autores han realizado ensayos similares en moco cutáneo e intestinal de diferentes especies de peces, pero en su caso utilizaron patógenos bacterianos, obteniéndose resultados variados (Vine y col., 2004[b]; Chabrillón y col., 2005 y 2006; Balcázar y col., 2007 y 2008; Sica y col., 2012).

Los aislados bacterianos que consiguieron reducir significativamente la adhesión de los quistes con las concentraciones bacterianas más bajas, pertenecían a la especie *Aeromonas sobria* seguida de *Pseudomonas fluorescens*. La bacteria *Pseudomonas fluorescens* LE 141, que presentó la mayor adhesión al moco cutáneo de trucha, obtuvo buenos resultados en las pruebas de exclusión y competición pero no desplazó a los quistes de *Saprolegnia parasitica* del moco.

Las bacterias descritas en el presente estudio que han mostrado su capacidad para reducir la adhesión de los quistes de *Saprolegnia parasitica* al moco cutáneo de trucha, podrían ser buenas candidatas para su utilización en la lucha biológica frente a la saprolegniosis en los salmónidos, pero para confirmar dicha utilidad es necesario realizar ensayos in vivo con peces infectados.

Conclusiones

PRIMERA. La flora bacteriana cutánea de la trucha común y la de la trucha arcoíris son cualitativamente diferentes. Factores como el ambiente y los tratamientos del agua con desinfectantes influyen en su composición. La flora bacteriana de la piel sana y la flora de las lesiones de saprolegniosis presentan grandes diferencias cualitativas y cuantitativas. A su vez el número de bacterias en la piel de la trucha común es menor en otoño, que es cuando suelen aparecer los primeros peces con saprolegniosis en los ríos de León.

SEGUNDA. *Iodobacter* fue el género bacteriano mayoritario en la piel de trucha común, *Aeromonas* en las lesiones de saprolegniosis de trucha común y *Chryseobacterium* en la piel de trucha arcoíris.

TERCERA. Las bacterias con mayor poder inhibitorio in vitro frente a *Saprolegnia parasitica* pertenecen a los géneros *Aeromonas*, *Pantoea, Pseudomonas*, *Serratia*, *Xanthomonas* y *Yersinia*. Muchos de los aislados bacterianos son a su vez fungicidas para *S. parasitica*. Las sustancias extracelulares de algunos de los aislados también son capaces de inhibir in vitro el crecimiento de *S. parasitica*.

CUARTA. Los aislados bacterianos utilizados no impiden la germinación de los quistes de *Saprolegnia parasitica*, pero reducen el crecimiento del micelio a partir de éstos con mayor eficacia que cuando el micelio ya está formado en los cañamones que se utilizan en los cultivos, lo que podría indicar que estas bacterias quizá tendrían una mayor acción preventiva que curativa en el supuesto de que llegasen a utilizarse en el control de la saprolegniosis.

QUINTA. Los aislados bacterianos más inhibitorios frente a *Saprolegnia parasitica* se adhieren in vitro en un porcentaje bajo al moco cutáneo de trucha común, y más al de macho que al de hembra. Por el contrario, los quistes de *S. parasitica* se adhieren en un elevado porcentaje al moco, y varios de los aislados bacterianos reducen esta adhesión especialmente bajo condiciones de exclusión y competición.

SEXTA. Los aislados bacterianos que tuvieron los mejores resultados en las pruebas in vitro de inhibición del crecimiento de *Saprolegnia parasitica*, y que a su vez fueron apatógenos para la trucha arcoíris, pertenecen a las

especies *Aeromonas sobria* y *Pseudomonas fluorescens*. Estas bacterias podrían ser buenas candidatas para su utilización en la lucha biológica contra la saprolegniosis, pero ello deberá demostrarse mediante estudios in vivo en trucha.

Anexos

ANEXO 1

RELACIÓN DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN: ácido desoxirribonucléico

ANOVA: análisis de la varianza

ARN: ácido ribonucléico

ASB: albúmina sérica bovina

BHI: brain heart infusion (infusión de cerebro y corazón)

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (herramienta de búsqueda que compara una secuencia problema con otras existentes en las bases de datos localizando las más parecidas)

cm: centímetro

col.: colaboradores

ºC: grados centígrados

d: día

DBA: *Dolichos biflorus* lectin (lectina de *Dolichos biflorus*)

DE: desviación estándar

D.O.: densidad óptica

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)

EMBL: European Molecular Biology Institute (Instituto de Biología Molecular Europeo)

fig: figura

g: gramo

GP: glucosa-peptona

h: hora

H_2O_2: peróxido de hidrógeno

H_2SO_4: ácido sulfúrico

KCl: cloruro potásico

KH_2PO_4: fosfato de potasio monobásico

KOH: hidróxido potásico

K-W: prueba de Kruskal-Wallis

L: litro

log: logaritmo en base 10

M: molar

mg: miligramo

$MgCl_2$: cloruro magnésico

$MgSO_4$: sulfato de magnesio

min: minuto

ml: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

Mn: manganeso

µl: microlitro

µm: micrómetro

N: normal

NaCl: cloruro sódico

Na_2HPO_4: fosfato disódico anhidro

NCBI: National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información en Biotecnología, USA)

ng: nanogramo

nm: nanómetro

OPD: o-phenylenediamine dihydrochloride (o-fenilendiamina dihidrocloruro)

Pág: página

PAS: periodic acid Schiff (ácido peryódico de Schiff)

PBS: phosphate buffered saline (tampón fosfato salino)

PCR: polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

ppm: partes por millón

p/v: peso/volumen

RFE: agua de río filtrada y esterilizada

rpm: revoluciones por minuto

s: segundo

SpHtp1: host-targeting protein 1

TBE: Tris-borate-EDTA (tampón tris-borato-EDTA)

TNPB: tryptone neutralised soya broth (caldo soja triptona neutralizado)

TSA: tryptone soya agar (agar soja triptona)

TSB: tryptone soya broth (caldo soja triptona)

UE: Unión Europea

UFC: unidades formadoras de colonias

V: voltio

v/v: volumen/volumen

ANEXO 2

RELACIÓN DE CUADROS

Pág

Cuadro 4.1. Identificación taxonómica de 137 aislados bacterianos seleccionados de la piel de trucha común sana, trucha común con saprolegniosis y trucha arcoíris sana..... **48**

Cuadro 4.2. Número de aislados bacterianos de cada una de las especies obtenidas de la piel de trucha común sana en las diferentes estaciones y puntos de muestreo. Los cultivos de las muestras del Centro Piscícola fueron negativos en primavera..... **50**

Cuadro 4.3. Número de aislados de las especies más representativas obtenidas de las lesiones de saprolegniosis en trucha común en las diferentes estaciones y puntos de muestreo. No se encontraron truchas con saprolegniosis en verano, ni en ninguna de las cuatro estaciones en el río Omaña..... **52**

Cuadro 5.1. Bacterias de la piel y de lesiones de saprolegniosis de trucha común y trucha arcoíris en las que se estudió su acción inhibitoria in vitro sobre *Saprolegnia parasitica*..... **66**

Cuadro 5.2. Grado de inhibición del crecimiento de *Saprolegnia parasitica* producido por 72 aislados bacterianos en agar BHI (prueba en placa), en medio líquido con una semilla de cáñamo colonizada por *S. parasitica* (prueba con cañamón) y en medio líquido con quistes (prueba con quistes..... **76**

Cuadro 5.3. Resultados de las pruebas in vitro realizadas con los 24 aislados bacterianos que presentaron mayor actividad inhibitoria frente a *Saprolegniaparasitica*..... **81**

Cuadro 6.1. Resultados obtenidos con los 8 aislados bacterianos que fueron patógenos para la trucha arcoíris tras inocular 10^6 células por vía intramuscular (im) o vía intraperitoneal (ip)..... **94**

Cuadro 7.1. Aislados bacterianos utilizados para las pruebas de adhesión al moco cutáneo de trucha común..... **101**

Cuadro 7.2. Porcentaje de adhesión (media ± DE de tres experimentos) de 15 aislados bacterianos al moco cutáneo de trucha común macho (MCM), al de trucha hembra (MCH), a la albúmina sérica bovina (ASB), al moco gástrico de cerdo (MGC) y al poliestireno..... **109**

Cuadro 7.3. Porcentaje de reducción de la adhesión de los quistes de *Saprolegnia parasitica* al moco cutáneo de trucha común macho en presencia de diferente número de células de 15 aislados bacterianos, bajo condiciones de exclusión, competición y desplazamiento..... **112**

ANEXO 3

RELACIÓN DE FIGURAS

Pág

Figura 3.1. Siembra por agotamiento. Cultivo de *Pseudomonas* sp. en agar TSA, 3 días a 20 ºC..... **30**

Figura 3.2. Recuento en cámara de Neubauer: vista de un cuadrado grande con células de *Aeromonas* sp. (200 ×)..... **31**

Figura 3.3. Recuento en placa. Siembra en agar TSA para determinar el número de unidades formadoras de colonias..... **32**

Figura 4.1. Localización geográfica de los puntos de muestreo de trucha común en el río Omaña (El Castillo), río Porma (entre Cerezales y Castrillo del Condado) y Centro Piscícola (Vegas del Condado), y de trucha arcoíris de piscifactorías situadas en el río Duerna (Velilla de la Valduerna), río Órbigo (Villanueva de Carrizo) y río Porma (Castrillo del Condado)..... **39**

Figuras 4.2 a 4.4. Obtención de la muestra cutánea en una trucha arcoíris. **4.2**. Raspado de la superficie cutánea, delimitada por un sacabocados de 16 mm de diámetro, tras haber añadido 1ml de PBS. **4.3**. Recogida de la suspensión formada tras el raspado. **4.4.** Aspecto de la superficie cutánea después de obtener la muestra (flecha)..... **41**

Figuras 4.5 a 4.7. Cultivos de raspados cutáneos de trucha en TSA a 20 ºC. **4.5.** Cultivo de 3 días de una trucha arcoíris sana. **4.6.** Cultivo de 7 días de una trucha común sana procendente de un estanque tratado con desinfectantes. **4.7.** Cultivo de 3 días de una lesión de saprolegniosis de una trucha común..... **41**

Figuras 4.8 a 4.11. Número de bacterias (media + DE) presentes en la piel de trucha común y de trucha arcoíris en relación con los factores siguientes: 4.8. Especie y estado de la piel; 4.9. Estación del año; 4.10. Lugar de procedencia de la trucha común; 4.11. Piscifactoría de la trucha arcoíris . No hubo truchas con saprolegniosis en verano y tampoco en el río Omaña. Las medias significativamente diferentes del resto están marcadas con un asterisco..... **46**

Figuras 5.1 a 5.3. Inhibición del crecimiento de *Saprolegnia parasitica* con bacterias. Primero se incubó la bacteria (estrías paralelas) a 20 ºC durante 7 días en agar BHI y seguidamente *S. parasitica* durante 4 días: **5.1.** Testigo negativo; **5.2.** Inhibición baja producida por *Deefgea* sp.; **5.3.** Inhibición alta producida por *Xanthomonas retroflexus*..... **75**

Figuras 5.4 a 5.6. Inhibición con bacterias del crecimiento del micelio de *Saprolegnia parasitica* a los 3 días de incubación a 20 ºC en medio líquido con cañamón: **5.4.** Cada fila de la placa contiene una bacteria a diferentes concentraciones, de mayor a menor y de izquierda a derecha; las bacterias son, de arriba abajo, *Deefgea rivuli* (1), *Iodobacter fluviatilis* (1) y *Aeromonas sobria* (2); **5.5.** Testigo negativo con crecimiento abundante de *S. parasitica*; **5.6.** Inhibición de *S. parasitica* producida por un aislado de *Aeromonas sobria*..... **77**

Figura. 5.7. Inhibición con bacterias de la germinación de los quistes de *Saprolegnia parasitica* a los 3 días de incubación a 20 ºC en medio líquido. Cada fila de la placa contiene diferentes concentraciones de una bacteria, de mayor a menor y de izquierda a derecha. Las bacterias probadas son, de arriba abajo, *Iodobacter* sp. (1), *Aeromonas piscicola* (1), *Pseudomonas fluorescens* (1) y *Aeromonas popoffii* (1)..... **78**

Figura 5.8. Inhibición con sobrenadantes bacterianos de la germinación de los quistes y de la formación de micelio de *Saprolegnia parasitica* a los 3 días a 20 ºC en medio líquido. Cada sobrenadante (dos pocillos) de izquierda a derecha y de arriba abajo, corresponde a las siguientes bacterias: *Xanthomonas retroflexus* (1), *Aeromonas piscicola* (1), *Aeromonas sobria* (1), *Pseudomonas fluorescens* (1), *Pantoea agglomerans* (1), *Serratia fonticola* (1), *Yersinia kristensenii* (1), *Pseudomonas fluorescens* (1), *Aeromonas salmonicida* (1) y *Aeromonas sobria* (2); los dos últimos pocillos pertenecen al testigo negativo..... **80**

Figura 6.1. Instalaciones (tanques y fuentes de agua fría) donde se efectuaron las pruebas de patogenicidad de las bacterias..... **91**

Figura 6.2. Inoculación intraperitoneal en una trucha arcoíris..... **92**

Figuras 6.3 y 6.4. Truchas arcoíris con úlceras cutáneas (flechas) producidas por *Aeromonas salmonicida* LE9 a los 10 días de la inoculación intramuscular..... **93**

Figura 6.5. a) Trucha arcoíris con el hígado pálido y con el bazo hipertrofiado y lesiones granulomatosas (flecha), a los 10 días de la inoculación intraperitoneal con *Aeromonas sobria* LE 104; b) Trucha testigo..... **93**

Figura 6.6. Trucha arcoíris con el bazo hipertrofiado (flecha) a los 10 días de la inoculación intraperitoneal con *Aeromonas sobria* LE 17..... **94**

Figura 7.1. *Aeromonas sobria* teñida con Syto® 9. (Escala: 10 µm)..... **103**

Figura 7.2. Quistes secundarios de *Saprolegnia parasitica* teñidos con Syto® 9. (Escala: 10 µm)..... **104**

Figura 7.3. Placas de poliestireno de 96 pocillos utilizadas en los ensayos de adhesión de las bacterias y de los quistes de *Saprolegnia parasitica* al moco cutáneo de trucha..... **105**

Figura 7.4. Prueba de ELISA para determinar la adhesión del moco cutáneo de trucha común a una placa de poliestireno. Filas A y B: moco cutáneo de truchas macho y hembra, respectivamente. Fila C: testigo positivo (moco gástrico de cerdo). Fila D: testigo negativo (albúmina sérica bovina)..... **108**

Figura 7.5. Porcentaje de adhesión (media + DE de tres experimentos) de los quistes de *Saprolegnia parasitica* al moco cutáneo de trucha común macho (MCM), al moco cutáneo de trucha común hembra (MCH), a la albúmina sérica bovina (ASB), al moco gástrico de cerdo (MGC) y al poliestireno..... **110**

Figura 7.6. Porcentaje de reducción de la adhesión de los quistes de *Saprolegnia parasitica* al moco cutáneo de trucha común macho (media + DE de tres experimentos), en presencia de los 4 aislados bacterianos que fueron eficaces en al menos dos de las tres condiciones probadas (exclusión, competición y desplazamiento); los resultados se expresan comparando con la adhesión de los quistes en los testigos (sin bacterias). * Indica el número mínimo de bacterias que redujo significativamente la adhesión de los quistes de *S. parasitica*..... **113**

Fotografias

M. T. Carbajal González: Fig. 3.2, 7.1 y 7.2.

Dr. J. M. Aller Gancedo: Fig. 3.1, 3.3, 4.2 a 4.7, 5.1 a 5.8, 6.1 a 6.6, 7.3 y 7.4.

ANEXO 4

RELACIÓN DE TRABAJOS DE LA TESIS DOCTORAL PUBLICADOS EN REVISTAS JCR

4.1. Carbajal González, M.T., Fregeneda Grandes, J.M., Suárez Ramos, S., Rodríguez Cadenas, F. y Aller Gancedo, J.M. (2011). Bacterial skin flora variation and *in vitro* inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* in brown trout and rainbow trout. *Dis Aquat Org, 96:* 125-135.

4.2. Carbajal González, M.T., Fregeneda Grandes, J.M., González Palacios, C. y Aller Gancedo, J.M. (2013). Adhesion to brown trout skin mucus, antagonism against cyst adhesion and pathogenicity to rainbow trout of some inhibitory bacteria against *Saprolegnia parasitica*. *Dis Aquat Org, 104:* 35-44.

Vol. 96: 125–135, 2011
doi: 10.3354/dao02391

DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS
Dis Aquat Org

Published September 9

Bacterial skin flora variation and *in vitro* inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* in brown and rainbow trout

M. T. Carbajal-González, J. M. Fregeneda-Grandes, S. Suárez-Ramos, F. Rodríguez Cadenas, J. M. Aller-Gancedo*

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León, Spain

ABSTRACT: Variations in the number and diversity of bacteria from the skin of brown trout *Salmo trutta* L. and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum were surveyed from different rivers and fish farms in northern Spain. In addition to determining bacterial populations in skin samples of healthy fish, bacterial populations were determined from skin lesions (of brown trout only) infected with *Saprolegnia parasitica*, the causal agent of saprolegniosis. Mean bacterial counts from skin lesions of brown trout suffering from saprolegniosis were nearly 1000 times greater than from the skin of uninfected brown and rainbow trout. More than 20 different genera of bacteria were identified, with isolates of *Aeromonas* and *Iodobacter* being the predominant genera associated with saprolegniosis lesions. The *in vitro* inhibitory activity of 72 of these skin isolates was tested against *S. parasitica* using 3 different assays. These included (1) assessing the inhibition by bacteria of colony growth on agar media, (2) the inhibition of colony growth from colonized hemp seeds in liquid media and (3) the inhibition of cyst germination in liquid media. Finally, the fungicidal effect of the 24 most inhibitory bacterial species, and the inhibitory activity of their culture supernatants, was tested in the same way. Isolates identified as *Aeromonas piscicola, A. sobria, Pantoea agglomerans* and *Pseudomonas fluorescens* achieved the highest inhibition against *S. parasitica*. Many of these inhibitory isolates were obtained primarily from skin lesions of fish with saprolegniosis. It is suggested that some of these isolates might be useful in the biological control of saprolegniosis.

KEY WORDS: *Saprolegnia parasitica* · Inhibition assays · Bacterial skin flora · Trout

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

Saprolegniosis is a disease of freshwater fish caused by *Saprolegnia* spp., which frequently appears in wild and farmed salmonids. For many years it has been a recurrent problem for brown trout in rivers and hatcheries in north-western Spain, usually emerging in the autumn and winter, coinciding with the spawning period.

Since the banning of malachite green in many countries, control of saprolegniosis has been based on other chemical substances, which, due to their low efficacy, potential toxicity or high cost, are not completely satisfactory. For these reasons, interest in the development of biocontrol measures has increased in the last few years. Bacteria from the skin flora may play a role in development of the disease, and some microorganisms could protect against *Saprolegnia parasitica* infection on fish (Petersen et al. 1994). Therefore, studying the local flora where the infection is established is likely to yield bacterial isolates potentially useful for biocontrol, as has been done with various other fish and amphibian infections (Spanggaard et al. 2001, Silva et al. 2005, Harris et al. 2006, Goldschmidt-Clermont et al. 2008, Aly et al. 2008, Fjellheim et al. 2010).

*Corresponding author. Email: jmallg@unileon.es

© Inter-Research 2011 · www.int-res.com

However, the selection of bacteria useful for biocontrol is a laborious task based on *in vitro* and *in vivo* tests on a large set of bacteria. *In vitro* tests, which are used as primary screening, usually comprise several independent tests, which means that they are focused on the demonstration of different bacterial properties. In the case of bacteria for control of *Saprolegnia* spp., inhibition of mycelium growth and cyst germination (Hatai & Willoughby 1988, Bly et al. 1997, Hussein & Hatai 2001, Lategan & Gibson 2003, Zhang et al. 2008), the ability to kill the organism and the capacity to attach to the mucus of fish are theoretically advantageous features. Studying production of extracellular substances by inhibitory bacteria would add information about their mechanism of action and might make it possible to isolate the inhibitory substance for management of fish health (Lategan et al. 2006). *In vivo* tests, used as secondary screening, are crucial in determining whether the bacteria are effective in the biocontrol of saprolegniosis (Lategan & Gibson 2003, Lategan et al. 2004).

The aim of the present work was to determine the *in vitro* inhibitory activity of bacteria found on the skin of brown and rainbow trout against *Saprolegnia parasitica*, in order to isolate one or more bacteria potentially useful for the biocontrol of saprolegniosis. We also present information on the inhibitory effects of bacterial supernatants and on variations in the bacterial populations found on the skin of healthy trout and of those infected with *S. parasitica*.

MATERIALS AND METHODS

Fish and isolation of bacteria

From April 2006 to January 2007, adult brown trout *Salmo trutta* L. (n = 96; 78 healthy and 18 with saprolegniosis caused by *Saprolegnia parasitica*) were collected from 3 different sites in the province of León, north-western Spain: (1) the River Porma, which has frequent outbreaks of saprolegniosis caused by *S. parasitica*; (2) the River Omaña, which has no record of the disease; and (3) a hatchery supplied with water from the River Porma, where infected trout are found every year. Healthy specimens were collected at seasonal intervals, and diseased specimens whenever present. Between December 2007 and January 2008, adult healthy rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum (n = 14) were obtained from 3 commercial fish farms located on the Rivers Duerna, Órbigo and Porma, also in the province of León.

All specimens were transported live to the laboratory, killed within 2 h of collection and their skin surface gently rinsed with sterile distilled water. Samples were obtained from the skin surface of healthy specimens and from cutaneous lesions in those with saprolegniosis. In hatchery brown trout displaying saprolegniosis, samples were also taken from areas of healthy skin. Skin surface samples were obtained by scraping the 2 cm^2 area inside the outline of a 16 mm punch placed on the skin surface, and containing 1 ml phosphate buffered saline (PBS) added as diluent. The resulting mixture was serially diluted in PBS, and 100 µl of the appropriate dilutions were spread onto tryptose soya agar (TSA, Cultimed) and sheep blood agar (bioMérieux®) plates. After aerobic cultivation for 7 d at 20°C, the plates were analysed for total counts using dilutions, as far as possible, with between 30 and 300 colonies. The number of colony-forming units (CFU) cm^{-2} of skin was estimated from the mean of CFU in blood agar and TSA, as the mean counts on these 2 media were similar (ANOVA, $p > 0.05$).

One colony of the most numerous bacterial types from plates derived from different fish was removed and sub-cultured until pure cultures were obtained. The selected bacterial isolates were stored frozen at −80°C in tryptose soya broth (TSB, Cultimed) with 30% v/v glycerol.

ANOVA or the Kruskal-Wallis test (K-W) was used to determine whether the differences between means or medians of bacterial counts (after log transformation) were significant ($p < 0.05$). All statistical tests were performed using Epi Info™ version 3.2.2 software.

Bacterial identification

Identification of bacterial isolates was carried out first using basic phenotypic methods and then molecular methods. The latter consisted of sequencing the fragment of the 16S rDNA gene amplified by the universal bacterial primers (both from Invitrogen) 27F (5′-AGA GTT TGA TC(A:C) TGG CTC AG-3′) and 1492R (5′-TAC GG(C:T) TAC CTT GTT ACG ACT T-3′). For identification to species level of isolates identified as belonging to the genus *Pseudomonas*, a fragment of the 23S rDNA gene was amplified by the primers (both from Invitrogen) fPs16S (5′-ACT GAC ACT GAG GTG CGA AAG CG-3′) and rPs23S (5′-ACC GTA TGC GCT TCT TCA CTT GAC C-3′) (Locatelli et al. 2002).

The sequences were compared with those available in the GenBank database using the BLASTn

algorithm at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank. Representative sequencing outputs are available at http://www.ebi.ac.uk/embl/Access/index.html under the accession numbers FN908434-FN908459.

Inhibition assays with bacteria

Bacterial and *Saprolegnia* isolates. A total of 72 bacterial isolates from trout skin, including 61 representatives of the different species identified in this study as well as 11 others from previous isolations in our laboratory (see Table 1), were tested against the *Saprolegnia parasitica* TRU 8 isolate obtained from a wild brown trout with saprolegniosis (Fregeneda-Grandes et al. 2000). To test the inhibitory activity of the bacterial isolates, 3 assays were carried out. The first tested the inhibition of hyphal growth on solid media (plate assay), the second and third tested the inhibition of hyphal growth and germination of cysts, respectively, in liquid media (broth assays).

Plate assay. This test was performed in Petri dishes with brain-heart infusion agar (BHI, Cultimed) inoculated with 2 parallel streaks of each bacterium, as described by Hussein & Hatai (2001). Two plates were prepared per bacterial isolate for each incubation time tested: 3, 5 or 7 d at 20°C, for a total of 6 plates per isolate. After incubation, a block of agar with *Saprolegnia parasitica* young hyphal tips, 3 mm diameter, was placed between the 2 bacterial streaks. The plates were subsequently incubated for 4 d at 20°C and the diameter of the *S. parasitica* colony measured. A negative control plate, without bacterial streaks, was assayed. The diameter reached by the *S. parasitica* colony was used as an indicator of inhibitory activity.

Broth assays (hemp seed test and cyst test). First, the bacterial isolates were inoculated into TSB and incubated at 20°C overnight. Following this, a 250 µl aliquot of the culture broth was inoculated into 12.5 ml of TSB and incubated until the estimated middle of the exponential growth phase on a rotary orbital shaker (Innova® 44, New Brunswick Scientific) at 20°C and 200 rpm (the estimate being based on previously established growth curves). The bacteria were pelleted by centrifuging at 1000 × *g* for 15 min and resuspended in sterile saline solution. The concentration of bacteria was adjusted (based on the optical density of the cultures) to 2×10^5 bacteria ml^{-1} for the assays with colonized hemp seeds, and to 4×10^5 bacteria ml^{-1} for the assays with zoospores, so that the final concentrations of bacteria in the 2 tests were equal. Taking this as the first dilution, five 10-fold dilutions of bacterial suspension were prepared.

In parallel, *Saprolegnia parasitica* was incubated for 3 d at 20°C on glucose peptone (GP) agar (Willoughby & Pickering 1977). Autoclaved half hemp seeds C*annabis sativa* were then placed on the edges of the colony and incubation was continued for another 24 h at 20°C. To obtain zoospores, the method described by Fregeneda-Grandes et al. (2000) was used. Briefly, half hemp seeds colonised by hyphae were placed in Petri dishes with filtered autoclaved river water, and incubated for 36 h at 20°C. The concentration of zoospores was then estimated using a Hawksley Cristalite BS 748 counting chamber and adjusted to 4×10^4 zoospores ml^{-1}.

For the test with a hemp seed colonized by *Saprolegnia parasitica* (hemp-seed test), 1 ml of each bacterial dilution, 1 ml of TSB and a half hemp seed colonized by *S. parasitica* were dispensed by duplicate into each well of a 24-well tissue culture plate (Falcon). Bacteria and *S. parasitica* negative controls were included on each plate. For the assay with the zoospores/cysts of *S. parasitica* (cyst test), the procedure was basically like the hemp-seed test, the only difference being that 0.5 ml of the zoospore suspension was added in place of a colonized hemp seed, and 0.5 ml of each bacterial dilution was used instead of 1 ml. Bacteria and *S. parasitica* zoospore negative controls were also included on each plate. Plates were incubated for 3 d at 20°C. Presence/absence of macroscopic or microscopic hyphal growth and germination of cysts was observed throughout the incubation period using a Nikon Diaphot inverted microscope and results were recorded on Day 3.

Assay to determine fungicidal effects

For this assay we used the 24 bacterial isolates with the highest inhibitory activity, as determined by the previous 3 tests. The bacterial and *Saprolegnia parasitica* isolates were prepared as for the hemp-seed test in broth assays. Then, 1 ml of each inhibitory bacterial dilution, 1 ml of TSB and a half hemp seed colonized by *S. parasitica* were dispensed by duplicate into each well of a 24-well plate and incubated at 20°C. Incubation times of 1, 2 or 3 d were tested. At the end of each period, the hemp seeds in the wells showing no *S. parasitica* growth were removed, washed 3 times with sterile distilled water, placed in a Petri dish with 20 ml of filtered and autoclaved river water containing 2×10^2 mg streptomycin l^{-1} and 2×10^5 UI penicillin l^{-1}, and incubated for 20 d at 20°C. False positive results due to inhibitory effects of bacteria remaining viable in the mycelium were avoided

by accepting the results only when there was no growth of bacteria from a sample of the water collected after 24 h. Negative control was achieved by incubating a hemp seed colonized by *S. parasitica* in water both with and without antibiotics. Absence of viability was determined when there was no growth of the mycelium.

Inhibition assays with bacterial culture supernatants

For these assays the same 24 bacterial isolates used in the test to study fungicidal effects were selected. The method described by Lategan et al. (2006) was used to prepare supernatants. In brief, after the bacteria had been cultivated in tryptone-neutralized peptone broth (TNPB) on a rotary shaker at 180 rpm for 36 h at 25°C, they were killed by heating in a water bath for 1 h at 70°C. Then the cultures were centrifuged at 15 000 × *g* for 20 min and the supernatant collected. Following this, the supernatants were filtered through a 0.22 µm syringe filter (Acrodisc®) and their pH was measured and adjusted to 7.0. This supernatant and three 2-fold serial dilutions in TNPB were tested.

Two broth assays were carried out. The purpose of the first was to investigate the capacity of the supernatants to inhibit hyphal growth (hemp-seed test). In this assay, 2 ml of each supernatant dilution and a half hemp seed colonized by *S. parasitica* were dispensed by duplicate into each well of a 24-well tissue culture plate. Wells with TNPB instead of the supernatants were included as negative controls. The purpose of the second assay was to investigate the capacity of the supernatants to inhibit cyst germination (cyst test). In this assay, 1 ml of each supernatant dilution and 1 ml of the zoospore suspension (prepared as described under 'Broth assays', above) were added to each well. Wells with TNPB instead of supernatants were included as negative controls. The same incubation times and observation procedures as in 'Broth assays', were completed.

RESULTS

Skin bacterial counts and identification of bacteria

The bacterial counts cm^{-2} of skin after log transformation of each type of sample are shown in Fig. 1. The geometric means of bacterial counts in healthy skin of brown trout with and without saprolegniosis were 57 and 179 CFU cm^{-2} respectively, with no significant differences between bacterial counts (K-W, $p > 0.05$). However, in lesions of saprolegniosis the geometric mean was much higher (57 518 CFU cm^{-2}). It was found that, on the skin of healthy brown trout, the mean bacterial counts in each season (from 23 to 168 CFU cm^{-2}) and at each sampling point (from 22 to 90 CFU cm^{-2}) were significantly different (K-W, $p < 0.001$ and ANOVA, $p = 0.0029$ respectively). A considerable difference (ANOVA, $p < 0.005$) was also found between the mean bacterial counts in fish from the 3 rainbow trout fish farms, which varied from 12 to 834 CFU cm^{-2} (ANOVA, $p < 0.005$).

In total, 137 bacteria were selected (119 from healthy and diseased brown trout and 18 from healthy rainbow trout) and 23 bacterial genera and 28 species were identified (Table 1). The identification to genus level was achieved by sequencing the 16S rRNA gene in all the isolates in which this method was used. However, using the phenotypic tests, only 56.2% of isolates were identified to genus level. Using molecular methods, identification to species level was achieved in 59.4% of the isolates. The results from phenotypic tests and from molecular identification were identical with respect to genera identified.

Species most frequently isolated from the skin of healthy brown trout were *Iodobacter* sp., *Deefgea rivuli* and *Yersinia kristensenii* (with all *Yersinia* isolates being obtained in summer); from the healthy skin of brown trout with saprolegniosis, *Iodobacter* sp. and *D. rivuli*; from saprolegniosis lesions on these individuals, *Iodobacter* sp., *Aeromonas sobria* and *Aeromonas* sp.; and from the skin of healthy rainbow trout, *Chryseobacterium* sp., *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus* sp., each species predominating at a different fish farm (Table 1).

Inhibition assays with bacteria

Plate assays. Because the highest difference in the inhibitory action upon mycelium growth among bacteria tested was observed when *Saprolegnia parasitica* was inoculated onto plates with bacterial cultures previously grown for 7 d, it was this incubation period against which degree of inhibition was measured. On the negative control plates the colony grew to 4 cm in diameter (Fig. 2). Presence of inhibitory activity was determined when the *S. parasitica* colony reached a diameter of 2.5 cm or less, and was observed in all 72 isolates. Inhibitory activity was then grouped into 3 inhibition levels depending on

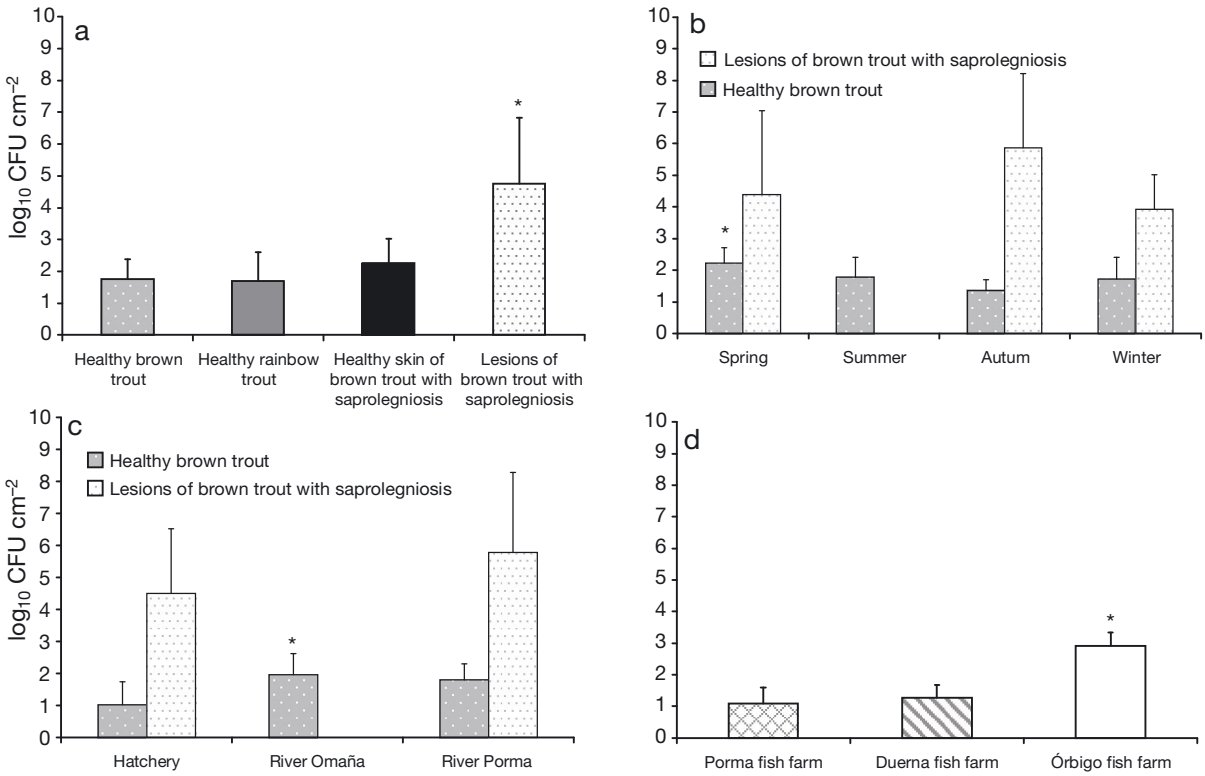


Fig. 1. Bacterial plate counts (mean CFU cm^{-2} + SD) from skin or lesions of brown trout *Salmo trutta* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. (a) Total; (b) by season; (c) by sampling location; (d) from 3 rainbow trout fish farms. No trout with saprolegniosis were found either in summer or in the river Omaña. Asterisk: significantly higher mean ($p < 0.05$) than the mean of the other samples; (b) and (c) only in healthy trout

the diameter reached by the *S. parasitica* colony (Tables 2 & 3).

Broth assays. For the hemp-seed test, the absence of macroscopic hyphal growth after 3 d of incubation was used to indicate inhibitory activity (Fig. 2). It was found that 41 out of the 72 bacterial isolates (56.9%) tested exhibited this activity at any dilution. The minimum number of bacteria added to the wells necessary for the inhibition of *S. parasitica* was used to establish 3 levels of inhibitory activity. The results of this assay are shown in Tables 2 & 3.

For the cyst test, it was observed that none of the 72 bacterial isolates inhibited cyst germination, but that the mycelium growth was inversely proportional to the concentration of bacteria added to the wells. Therefore, absence of macroscopic growth at any dilution after 3 d of incubation was considered as inhibitory activity, and it was found in 52 out of the 72 isolates (72.2%). Depending on the minimal concentration of bacteria necessary for this effect, 3 levels of inhibition were fixed. The results of this assay are shown in Tables 2 & 3.

Fungicidal effect of the bacteria. Fifteen of the 24 bacteria species tested proved to be lethal for *Saprolegnia parasitica* under any of the conditions assayed (Table 3). A small and atrophied brown mycelium was observed after 20 d of incubation in water, in contrast to the control plates and plates with the non-fungicidal bacteria, in which the mycelium grew and produced zoospores. The bacteria caused the lethal effect on *S. parasitica* only up to the second dilution (2×10^4 bacteria per well), and with at least 2 d of incubation together at 20°C.

Most inhibitory isolates. The isolates with high inhibitory activity in the plate assay, capable of inhibiting *Saprolegnia parasitica* with a lower concentration of bacteria in the broth assays and also with fungicidal effect, were considered the best (Table 3). These isolates belonged to the species *Aeromonas piscicola, A. sobria, Pantoea agglomerans* and *Pseudomonas fluorescens*, many of them (66.6%) obtained from saprolegniosis lesions.

Inhibition assays with the bacterial culture supernatants. In the broth assay with colonized hemp seeds, it was observed that 19 of the 24 bacterial supernatants tested showed inhibition of *Saprolegnia parasitica* mycelium growth after 3 d of incubation. Total inhibition was observed at the first dilu-

Table 1. Taxonomic identification of bacteria isolated from skin of brown trout *Salmo trutta* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, and of bacterial isolates used in the *in vitro* inhibition assays against *Saprolegnia parasitica*

Bacteria	Healthy brown trout	Brown trout with saprolegniosis		Healthy rainbow trout	Total isolates	Isolates used in the inhibition assays
		Healthy skin	Lesions			
Achromobacter xylosoxidans	2	0	0	0	2	1
Acinetobacter lwoffii	0	0	1	0	1	1
Acinetobacter johnsonii[a]	–	–	–	–	–	2
Acinetobacter sp.	1	0	1	0	2	0
Aeromonas piscicola	0	0	1	0	1	1
Aeromonas popoffii	0	0	3	0	3	2
Aeromonas salmonicida	0	0	3	0	3	1
Aeromonas salmonicida[a]	–	–	–	–	–	1
Aeromonas sobria	2	1	10	0	13	9
Aeromonas sp.	0	1	6	0	7	0
Brevundimonas nasdae	1	0	0	0	1	0
Carnobacterium maltaromaticum	1	1	1	0	3	1
Chryseobacterium sp.	3	0	0	6	9	3
Deefgea rivuli	6	2	0	0	8	3
Flavobacterium succinicans	1	0	0	0	1	0
Flavobacterium sp.	1	1	1	0	3	2
Flavobacterium sp.[a]	–	–	–	–	–	1
Frigoribacterium sp.	0	0	0	1	1	1
Gram-negative rods	0	0	0	1	1	0
Gram-positive rods	0	0	0	1	1	0
Iodobacter fluviatilis	2	0	1	0	3	1
Iodobacter sp.	9	2	11	0	22	6
Iodobacter sp.[a]	–	–	–	–	–	1
Janthinobacterium lividum	2	0	0	0	2	1
Janthinobacterium sp.	1	0	0	0	1	1
Kocuria rhizophila	2	0	0	0	2	1
Kurthia zopfii	0	0	1	0	1	1
Microbacterium foliorum	1	0	0	0	1	1
Microbacterium hydrocarbonoxydans	1	0	0	0	1	1
Microbacterium phyllosphaerae	1	0	0	0	1	0
Microbacterium sp.	1	0	0	0	1	1
Moraxella osloensis	0	0	0	1	1	1
Pantoea agglomerans	3	0	0	0	3	3
Plantibacter agrosticola	0	1	0	0	1	1
Pseudomonas fluorescens	1	1	4	4	10	5
Pseudomonas fluorescens[a]	–	–	–	–	–	1
Rhodococcus fascians	1	0	0	0	1	1
Rhodococcus fascians[a]	–	–	–	–	–	1
Rhodococcus sp.	2	1	0	1	4	1
Serratia fonticola	2	0	0	0	2	1
Staphylococcus aureus[a]	–	–	–	–	–	1
Staphylococcus equorum[a]	–	–	–	–	–	3
Staphylococcus pasteuri	1	1	0	0	2	1
Staphylococcus sp.	3	1	1	3	8	2
Xanthomonas retroflexus	1	0	0	0	1	1
Yersinia enterocolitica	2	0	0	0	2	2
Yersinia intermedia	2	0	0	0	2	1
Yersinia kristensenii	5	0	0	0	5	2
Total	61	13	45	18	137	72

[a]From previous isolations, skin of brown trout *S. trutta*

tion, and was achieved by only 10 bacterial isolates. This was considered high inhibition. If mycelium growth was reduced in comparison to the control, but not inhibited totally, it was considered low inhibition (Table 3).

When bacterial supernatants were used in the cyst test, the growth of mycelia from the cysts, but not their germination, was inhibited in 20 of the 24 isolates tested. After 3 d of incubation, 14 of these isolates showed high inhibition at first dilution (Table 3).

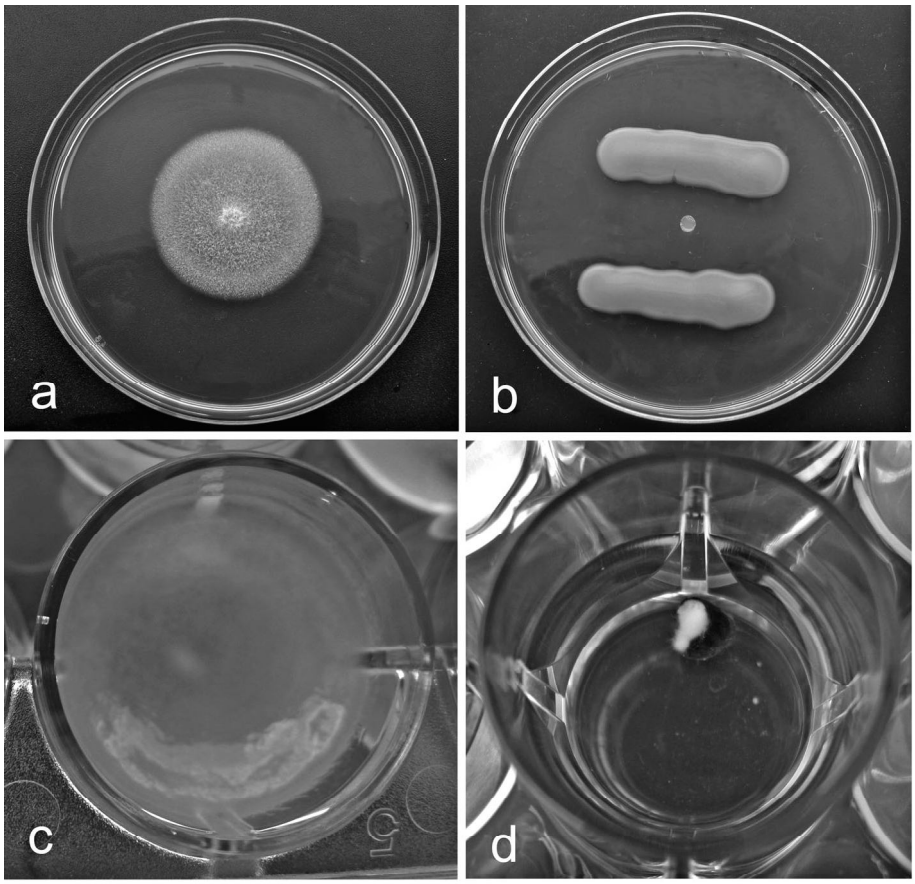


Fig. 2. *In vitro* inhibition assays of *Saprolegnia parasitica* with bacteria on solid media and in 24-well tissue culture plates with colonized hemp seed and liquid media. (a) Control plate (solid medium) with *S. parasitica* after 4 d at 20°C. (b) High inhibition of *S. parasitica* (solid medium) caused by a *Xanthomonas retroflexus* isolate after 4 d at 20°C, with bacteria previously grown for 7 d. (c) Control well (liquid medium) with *S. parasitica* after 3 d at 20°C. (d) High inhibition of *S. parasitica* (liquid medium) caused by an *Aeromonas sobria* isolate after 3 d at 20°C

Table 2. Degree of inhibition of *Saprolegnia parasitica* achieved by 72 bacterial isolates in assays on BHI agar (plate assays), in liquid media with hemp seed colonized by *S. parasitica* (hemp seed test) and in liquid media with cysts of *S. parasitica* (cyst test)

Test	Degree of inhibition	Indicator of degree of inhibition	Bacterial isolates with inhibitory activity No.	Total (% of total tested)
Plate assay		Diameter of *S. parasitica* colony after 4 d at 20°C[a]		72 (100%)
	Low	1.5–2.5 cm	13	
	Medium	0.7–1.5 cm	12	
	High	<0.7 cm	47	
Hemp seed test		Total inhibition of macroscopic mycelium growth after 3 d at 20°C		41 (56.9%)
	Low	with 2×10^5 bacteria	10	
	Medium	with 2×10^4 bacteria	5	
	High	with $\leq 2 \times 10^3$ bacteria	26	
Cyst test		Total inhibition of macroscopic mycelium growth after 3 d at 20°C		52 (72.2%)
	Low	with 2×10^5 bacteria	16	
	Medium	with 2×10^4 to 2×10^3 bacteria	9	
	High	with $\leq 2 \times 10^2$ bacteria	27	

[a]*S. parasitica* added after incubation of bacteria for 7 d at 20°C

Table 3. Results of all *in vitro* tests performed with 24 bacterial isolates with high inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica*. HBT: healthy brown trout; BTSH: brown trout with saprolegniosis, healthy skin; BTSL: brown trout with saprolegniosis, lesions; HRT: healthy rainbow trout; bracketed nos.: minimum number of bacteria causing total inhibition of macroscopic mycelium growth. Supernatants inhibition: High (total absence of macroscopic mycelium growth achieved with first dilution after 3 d of incubation at 20°C); Low (partial inhibition of macroscopic mycelium growth achieved with first dilution

Species	Bacterial isolate	Origin	Plate assays	Broth assays		Fungicidal effect	Inhibitory activity of supernatants	
				Hemp seed test	Cyst test		Hemp seed test	Cyst test
Aeromonas piscicola[a]	LE 21	BTSL	High	High (200)	High (20)	Yes	High	High
A. popoffii	LE 65	BTSL	High	High (20)	High (20)	No	High	High
A. popoffii	LE 69	BTSL	High	High (200)	High (200)	Yes	High	High
A. salmonicida	LE 9	BTSL	High	High (20)	High (20)	No	High	High
A. salmonicida	LE 99	BTSL	High	High (20)	High (20)	No	High	High
A. sobria	LE 17	BTSL	High	High (20)	High (20)	No	High	Low
A. sobria	LE 51	HBT	High	High (2000)	High (20)	Yes	High	High
A. sobria	LE 68	BTSL	High	High (20)	High (20)	No	High	High
A. sobria[a]	LE 74	BTSL	High	High (200)	High (20)	Yes	Low	High
A. sobria	LE 76	BTSL	High	High (20)	High (20)	No	High	High
A. sobria	LE 100	BTSL	High	High (20)	High (20)	No	Low	High
A. sobria	LE 104	BTSH	High	High (20)	High (20)	Yes	High	High
Pantoea agglomerans	LE 35	HBT	High	High (2000)	High (200)	Yes	No	No
P. agglomerans	LE 36	HBT	High	High (2000)	High (200)	Yes	No	No
P. agglomerans[a]	LE 37	HBT	High	High (200)	High (20)	Yes	Low	Low
Pseudomonas fluorescens	LE 89	HBT	High	High (2000)	High (20)	Yes	Low	High
P. fluorescens[a]	LE 98	BTSL	High	High (200)	High (20)	Yes	Low	Low
P. fluorescens[a]	LE 122	BTSL	High	High (200)	High (20)	Yes	Low	High
P. fluorescens	LE 141	HRT	High	High (200)	High (20)	No	Low	Low
P. fluorescens[a]	LE 143	HRT	High	High (200)	High (20)	Yes	Low	Low
Serratia fonticola	LE 52	HBT	High	High (2000)	High (200)	Yes	No	No
Xanthomonas retroflexus	LE 38	HBT	High	High (2000)	High (200)	No	Low	High
Yersinia kristensenii	LE 54	HBT	High	High (2000)	High (200)	Yes	No	No
Y. kristensenii	LE 58	HBT	High	High (2000)	High (200)	Yes	No	Low

[a]These isolates considered the best, taking into account minimum number of bacteria necessary for inhibition of *S. parasitica* in broth assays, and fungicidal effect

DISCUSSION

In the present study, it was observed that the bacterial skin flora of brown trout is dependent on factors such as season and habitat. Furthermore, the predominant bacterial genera and species of this flora were identified and some of them shown to have *in vitro* inhibitory capability against *Saprolegnia parasitica*. Thus, these are candidates for further study in the biocontrol of saprolegniosis.

Making comparisons among studies involving bacterial counts is complex, as several factors are involved. Among these are the method of taking the sample from the fish and the culture media used (Spanggaard et al. 2000, Nedoluha et al. 2001, Huber et al. 2004, Romero & Navarrete 2006). Austin (2006) reported that, generally, bacterial populations on the skin of fish range from 10^2 to 10^4 bacteria cm^{-2}. In the present study, the aerobic-bacteria counts on the healthy skin of brown trout and rainbow trout were markedly below those found by González et al. (1999) in the same species of fish from the province of León using the skin scraping method. This disagreement of findings may be caused by differences in sampling method, given that these investigators transported the fish dead in plastic boxes to the laboratory within 6 h of collection, and in the culture media used. In the current study, high variability was found in bacterial counts, as well as significant differences among bacterial mean counts on the skin of healthy brown trout during different seasons. Al-Harbi & Uddin (2004) found seasonal differences in the intestinal flora of tilapia and related them to oscillations in the water temperature, higher bacterial concentrations being more likely at increased water temperature. However, the flora of fish can also be influenced by other environmental factors, which may explain why, in the present study, bacterial counts were highest in spring and lowest in autumn, when

the first trout with saprolegniosis usually appear in the province of León. This fact, in addition to the fact that the very highest counts were found in specimens from the river Omaña, which has no record of outbreaks of the disease, might indicate that microflora on the skin are related to the presence of saprolegniosis.

In fish farms, disinfectants are often added to the water to control a range of organisms. This may have an adverse effect on bacterial flora of the skin, and may well explain the fact that the lowest bacterial counts were observed in hatchery brown trout. Moreover, the highest counts in rainbow trout were obtained from the Órbigo fish farm, where chemical treatments were not used.

With regard to the bacterial species found on the skin of our trout specimens, a greater diversity of species was observed on healthy skin than in lesions. *Iodobacter* was the genus most frequently isolated from the skin of healthy brown trout, and *Aeromonas* from saprolegniosis lesions. In contrast to the report of González et al. (1999), we found *Aeromonas* sp. to be sparse on healthy trout, probably because of the differences in sampling methods used.

Among the 4 inhibition assays performed in the present study, the assays on solid media seemed to be less useful than the others in judging the extent of the inhibitory activity of the bacterial isolates, because on BHI agar all of them inhibited growth of *Saprolegnia parasitica* to different degrees, with about two-thirds of the isolates inhibiting growth completely. Moreover, bacteria that were inhibitory in broth assays also showed considerable inhibition on solid media, but the opposite was not true. Hussein & Hatai (2001) observed inhibition with only 5 out of 47 strains using HI agar, but afterwards they demonstrated that the inhibition was increased by using BHI. However, Zhang et al. (2008) observed a low inhibitory activity of bacteria against pathogenic members of *Saprolegnia* on BHI. These authors demonstrated that the composition of the culture media could affect the inhibitory activity of *Serratia marcescens* against *Saprolegnia* spp. and that the highest inhibition was obtained on potato dextrose agar followed by BHI.

In liquid media, it was observed that none of the isolates tested inhibited the germination of cysts, but they did reduce the growth of the resulting mycelium. The inhibition of cyst germination has already been studied by other investigators with contradictory results (Bly et al. 1997, Lategan & Gibson 2003, Zhang et al. 2008). In the present study *Saprolegnia parasitica* mycelium growth from cysts was inhibited at lower concentrations of the bacteria than were hyphae from colonized hemp seed. This may be due to the longer time necessary for hyphae to grow from the cysts than for the hemp seed, where the mycelium was already present.

The bacterial isolates with the strongest inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* in the assays with bacterial cells belonged to the genera *Aeromonas*, *Pantoea* and *Pseudomonas*, many of them being isolated from lesions of saprolegniosis. Hatai & Willoughby (1988) and Hussein & Hatai (2001) likewise isolated *Aeromonas* and *Pseudomonas* with inhibitory properties from saprolegniosis lesions. The latter investigators stated that the presence of inhibitory bacteria in saprolegniosis lesions may be relevant, given the fact that microbial interactions in the lesions are a possible reason for the spontaneous recovery of some trout with saprolegniosis. In contrast, Petersen et al. (1994) found unidentified bacteria antagonistic to *S. parasitica* in the skin mucus of healthy rainbow trout, but not in those with saprolegniosis.

The *in vitro* inhibitory activity of *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia* spp. against *Saprolegnia* spp. has been described by several authors (Hatai & Willoughby 1988, Bly et al. 1997, Zhang et al. 2008). In the present study, most of the isolates identified as *P. fluorescens* and one belonging to the genus *Serratia* showed a fairly strong antagonistic activity.

It was also observed that, in agreement with Lategan et al. (2006), some bacteria were able to kill *Saprolegnia parasitica*. This is an interesting finding. Not only did these bacteria not cause infection, but they could also cure incipient lesions.

The mechanism involved in anti-*Saprolegnia* bacterial activity is unknown, but the fact that both the vegetative and cyst stages were harmed could have significant implications for *in vivo* control of *Saprolegnia* spp. infections in fish farms and hatcheries (Lategan & Gibson 2003). In the present study most of the bacterial supernatants inhibited the *in vitro* growth of *Saprolegnia parasitica,* which suggests that a substance secreted into the medium causes or participates in the inhibitory effect of the bacteria. Furthermore, higher sensitivity to the bacterial supernatants of mycelia grown from cysts than of those grown from hemp seed was demonstrated, as was also observed by Zhang et al. (2008). The strongest inhibitory activity was shown by the supernatants of bacteria belonging to the genus *Aeromonas*, whereas those produced by *Enterobacteriaceae* did not show this inhibitory effect — although, because these bacteria are fungicidal, other mecha-

nisms might be implicated for this property. Lategan & Gibson (2003) found a bacteriocin-like substance secreted by a strain of *Aeromonas media*, which had inhibitory activity against *Saprolegnia* sp. and other pathogens; its main component was identified to be indole (Lategan et al. 2006). Zhang et al. (2008) also found that the supernatant of a *Serratia marcescens* strain was inhibitory against *Saprolegnia* sp. However, other investigators found no inhibition to be caused by bacterial supernatants (Bly et al. 1997, Hussein & Hatai 2001), and speculated that other mechanisms might be implicated, such as competition for iron, or capacity to degrade cellulose or to liquefy gelatine.

In the present work, bacteria from both healthy skin and saprolegniosis lesions in trout were isolated. Some of them, mostly *Aeromonas* and *Pseudomonas* isolates, showed strong inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* in the various *in vitro* assays performed. These bacteria are good candidates for use in the biological control of saprolegniosis (by oral route or added to water), but further work is necessary to determine the degree of danger of these bacteria to fish (given the fact that some inhibitory isolates belong to species that cause diseases in fish) and other characteristics, such as their capacity to adhere to the skin mucus of fish.

Acknowledgements. This work formed part of the research project AGL2006-03374 financed by the Spanish Ministry of Education and Science (Ministerio de Educación y Ciencia) and the European Regional Development Fund (ERDF). M.T.C.G. was supported by a fellowship from the Educational Bureau of the Regional Government of Castile and León (Junta de Castilla y León, Consejería de Educación), co-financed by the European Social Fund. We thank the Local Environmental Service in León of the Regional Government of Castile and León (Servicio Territorial de Medio Ambiente de León, Junta de Castilla y León) for helping us in the collection of brown trout from the rivers and from the Vegas del Condado hatchery. We also thank B. Austin, D. Austin and M. Barker, of Heriot-Watt University, Edinburgh, for their help in the sequencing of the 16S rDNA of some of the bacteria.

LITERATURE CITED

Al-Harbi AH, Uddin MN (2004) Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. Aquaculture 229:37–44

Aly SM, Abd-El-Rahman AM, John G, Mohamed MF (2008) Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. Aquaculture 277:1–6

Austin B (2006) The bacterial microflora of fish, revised. Sci World J 6:931–945

Bly JE, Quiniou SMA, Lawson LA, Clem LM (1997) Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens.* J Fish Dis 20:35–40

Fjellheim AJ, Klinkenberg G, Skjermo J, Aasen IM, Vadstein O (2010) Selection of candidate probionts by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. Vet Microbiol 144:153–159

Fregeneda-Grandes JM, Fernández-Díez M, Aller-Gancedo JM (2000) Ultrastructural analysis of *Saprolegnia* secondary zoospore cyst ornamentation from infected wild brown trout, *Salmo trutta* L., and river water indicates two distinct morphotypes amongst long-spined isolates. J Fish Dis 23:147–160

Goldschmidt-Clermont E, Wahli T, Frey J, Burr SE (2008) Identification of bacteria from the normal flora of perch, *Perca fluviatilis* L., and evaluation of their inhibitory potential towards *Aeromonas* species. J Fish Dis 31: 353–359

González CJ, López-Díaz TM, García-López ML, Prieto M, Otero A (1999) Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*), and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Food Prot 62: 1270–1277

Harris NR, James TY, Lauer A, Simon NA, Patel A (2006) Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. EcoHealth 3:53–56

Hatai K, Willoughby LG (1988) *Saprolegnia parasitica* from rainbow trout inhibited by the bacterium *Pseudomonas fluorescens.* Bull Eur Assoc Fish Pathol 8:27–29

Huber I, Spanggaard B, Appel KF, Rossen L, Nielsen T, Gram L (2004) Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). J Appl Microbiol 96:117–132

Hussein MA, Hatai K (2001) *In vitro* inhibition of *Saprolegnia* by bacteria isolated from lesions of salmonids with saprolegniasis. Fish Pathol 36:73–78

Lategan MJ, Gibson LF (2003) Antagonistic activity of *Aeromonas media* strain A199 against *Saprolegnia* sp., an opportunistic pathogen of the eel, *Anguilla australis* Richardson. J Fish Dis 26:147–153

Lategan MJ, Torpy FR, Gibson LF (2004) Biocontrol of saprolegniosis in silver perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell) by *Aeromonas media* strain A199. Aquaculture 235:77–88

Lategan MJ, Booth W, Shimmon R, Gibson LF (2006) An inhibitory substance produced by *Aeromonas media* A199, an aquatic probiotic. Aquaculture 254:115–124

Locatelli L, Tarnawski S, Hamelin J, Rossi P, Aragno M, Fromin N (2002) Specific PCR amplification for the genus *Pseudomonas* targeting the 3′ half of 16S rDNA and the whole 16S-23S rDNA spacer. Syst Appl Microbiol 25: 220–227

Nedoluha PC, Owens S, Russek-Cohen E, Westhoff D (2001) Effect of sampling method on the representative recovery of microorganisms from the surfaces of aquacultured finfish. J Food Prot 64:1515–1520

Petersen A, Jegstrup I, Olson LW (1994) Screening for bacteria antagonistic to *Saprolegnia parasitica* with BASF Pluronic Polyol F-127. In: Mueller GJ (ed) Salmon saprolegniasis. US Department of Energy, Bonneville Power Administration, Portland, OR, p 149–160

Romero J, Navarrete P (2006) 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life

stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Microb Ecol 51:422–430

Silva FCP, Brito MFG, Farias LM, Nicoli JR (2005) Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz. J Fish Biol 67:1686–1698

Spanggaard B, Huber I, Nielsen J, Nielsen T, Appel KF, Gram L (2000) The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. Aquaculture 182:1–15

Spanggaard B, Huber I, Nielsen J, Sick EB and others (2001) The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. Environ Microbiol 3: 755–765

Willoughby LG, Pickering AD (1977) Viable saprolegniaceae spores on the epidermis of the salmonid fish *Salmo trutta* and *Salvelinus alpinus.* Trans Br Mycol Soc 68: 91–95

Zhang SJ, Yang XL, Li D, Li Y, Gao P (2008) Screening of antagonistic bacterium strain against saprolegniosis and the preliminary study of *in vitro* antagonistic activity. Acta Hydrobiol Sin 32:301–307

Editorial responsibility: David Bruno, Aberdeen, UK

Submitted: December 27, 2010; Accepted: June 29, 2011
Proofs received from author(s): August 21, 2011

This authors' personal copy may not be publicly or systematically copied or distributed, or posted on the Open Web, except with written permission of the copyright holder(s). It may be distributed to interested individuals on request.

Vol. 104: 35–44, 2013
doi: 10.3354/dao02582

DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS
Dis Aquat Org

Published April 29

Adhesion to brown trout skin mucus, antagonism against cyst adhesion and pathogenicity to rainbow trout of some inhibitory bacteria against *Saprolegnia parasitica*

M. T. Carbajal-González, J. M. Fregeneda-Grandes, C. González-Palacios, J. M. Aller-Gancedo*

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León, Spain

ABSTRACT: Biological control of saprolegniosis with bacteria might be an alternative to the use of chemical compounds. Among criteria for the selection of such bacteria are their absence of pathogenicity to fish and their ability to prevent adhesion of the pathogen to the skin mucus. The pathogenicity to rainbow trout of 21 bacterial isolates with *in vitro* inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* was studied. Fifteen of the isolates, identified as *Aeromonas sobria*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia fonticola*, *Xanthomonas retroflexus* and *Yersinia kristensenii*, were non-pathogenic when injected into rainbow trout. Their capacity to adhere to the skin mucus of male and female brown trout and to reduce the adhesion of *S. parasitica* cysts under exclusion, competition and displacement conditions was tested. The 15 bacterial isolates showed a low adhesion rate, ranging between 1.7% (for an *A. sobria* isolate) and 15.3% (a *P. fluorescens* isolate). This adhesion was greater in the case of mucus from male brown trout than from females. Similarities in the adhesion to male mucus and other substrates and correlation to that observed to polystyrene suggest that adhesion to skin mucus does not depend on the substrate. A high percentage (88.9%) of the *S. parasitica* cysts adhered to the skin mucus of male brown trout. Almost all of the bacteria reduced this adhesion ratio significantly under exclusion and competition conditions. However, only half of the isolates displaced cysts from skin mucus, and more bacterial cells were necessary for this effect. A novel method to study the adhesion of *S. parasitica* cysts to skin mucus of trout and their interactions with inhibitory bacteria is described.

KEY WORDS: *Saprolegniosis* · Epidermal biota · Mucin · Binding ability · *Salmo trutta*

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

Saprolegniosis is a tegumentary disease of freshwater fish which can be observed by the presence of cotton-like tufts and ulcers on the skin. It is caused by members of the genus *Saprolegnia*, which nowadays is clasified into the kingdom Chromista. To prevent and control salmonid saprolegniosis in fish farms, different chemical compounds are used. Independently of their efficacy, the inappropriate use of these products has a potential risk for public health and for the environment. One of the alternatives that is gaining increasing attention, apart from the use of natural substances such as essential oils (Muzzarelli et al. 2001, Khosravi et al. 2012), is the biological control of saprolegniosis. The *in vitro* inhibitory effects of some bacteria against *Saprolegnia* spp. have been described in several studies (Hatai & Willoughby 1988, Bly et al. 1997, Hussein & Hatai 2001, Lategan & Gibson 2003, Zhang et al. 2008, Nurhajati et al. 2012, Ran et al. 2012).

Carbajal-González et al. (2011) found that certain bacteria from the skin of brown trout *Salmo trutta*

*Corresponding author. Email: jmallg@unileon.es

© Inter-Research 2013 · www.int-res.com

Author copy

and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* can inhibit or render difficult the *in vitro* growth of *Saprolegnia parasitica*. Hence some of these bacteria might be useful in the biological control of saprolegniosis. *Saprolegnia* spp. infections are produced mainly via the skin; therefore, the skin mucus is the first barrier that *S. parasitica* must overcome if the skin is not cut or abraded. The ability of some potential probiotic bacteria to adhere to the skin and intestinal mucus of various fish species and to reduce the binding of some pathogens has previously been investigated (Nikoskelainen et al. 2001, Vine et al. 2004, Chabrillón et al. 2005, 2006, Balcázar et al. 2007, 2008, Sica et al. 2012).

In the present study, we tested the absence of pathogenicity of a selection of inhibitory bacteria of *Saprolegnia parasitica* against rainbow trout. This was followed up by testing the effectiveness of the benign strains to adhere to the skin mucus of trout, and to reduce the adhesiveness of *S. parasitica* cysts when pre-inoculated (exclusion), added with the cysts (competition) or added after them (displacement). These studies will enable suitable bacterial isolates that may be of use in the biological control of saprolegniosis to be identified for further study.

MATERIALS AND METHODS

Pathogenicity for rainbow trout

Fish and bacterial isolates

Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* were obtained from a commercial fish farm in the Province of León in Spain. The weight of the fish was 53 ± 16.2 g (mean ± SD) in the first challenge and 28.7 ± 9.2 g in the second. They were maintained for at least 10 d in aerated, free-flowing well water at 15°C so as to ensure their acclimatization.

We used 21 bacterial isolates which had been obtained from healthy skin and from saprolegniosis lesions of brown trout and healthy rainbow trout collected from rivers and fish farms in the Province of León. These isolates, which had shown a high inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* mycelium in previous *in vitro* assays, belonged to the species *Aeromonas popoffii* (2 isolates), *A. sobria* (7), *Pantoea agglomerans* (3), *Pseudomonas fluorescens* (5), *Serratia fonticola* (1), *Xanthomonas retroflexus* (1) and *Yersinia kristensenii* (2) (Carbajal-Gonzáles et al. 2011, their Table 3; *A. salmonicida* and *A. piscicola* were rejected).

Challenge to fish

To test the absence of pathogenicity of the bacteria to rainbow trout, 2 serial challenges were carried out: the first to eliminate any pathogenic bacteria and the second to confirm, with a larger number of fish, that these bacteria were actually non-pathogenic.

The bacterial isolates were grown in tryptone soy broth (Cultimed) at 20°C overnight. The cells were harvested by centrifugation at 1000 × *g* (10 min at 4°C), re-suspended in saline solution (0.9% NaCl w/v), counted in a haemocytometer chamber (Improved Neubauer Type, Albert Sass) at a magnification of 400× and adjusted to 10^7 cells ml^{-1}. A volume of 0.1 ml was injected intraperitoneally (i.p.) and intramuscularly (i.m.) into separate groups of 5 trout for the first challenge and 20 trout for the second. Control groups of 5 trout for the first challenge and 20 for the second were injected at the same points with 0.1 ml of saline solution. All fish were maintained under the same conditions in 40 l tanks at a flow rate of approximately 1 l min^{-1}. The dead and moribund fish and the survivors after 10 d (first challenge) or after 14 d (second challenge) were examined for evidence of disease. Loopfuls of material from the kidney, liver and spleen were spread over plates of tryptone soy agar (Cultimed) with incubation at 20°C for 7 d to determine the presence or absence of the inoculated bacterial isolates in the fish. The bacterial isolates recovered were examined by means of Gram-stained smears and biochemical tests (API 20 E and API20 NE, Biomerieux®).

Assays of adhesion to skin mucus

Bacteria and *Saprolegnia* isolates and skin mucus

We selected the 15 bacterial isolates that showed no pathogenicity, as determined in the previous assays. They belonged to the genera *Aeromonas* (3 isolates), *Pantoea* (3), *Pseudomonas* (5), *Serratia* (1), *Xanthomonas* (1) and *Yersinia* (2). The isolate of *Saprolegnia parasitica* Tru8, which was obtained from a wild brown trout with saprolegniosis (Fregeneda-Grandes et al. 2000), was used for these assays. Zoospores and cysts were obtained as described by Fregeneda-Grandes et al. (2000), that is, by incubating hemp seed halves previously colonized by *S. parasitica* in sterile and filtered river water for 36 h at 20°C and harvesting them.

Healthy male and female brown trout (4 specimens of each sex) were obtained from a hatchery belong-

Author copy

ing to the Regional Government of Castile and Léon (Junta de Castilla y León), to prepare separate pools of skin mucus for the assays. Fish with body weights of 138.6 ± 76.5 g were carried alive to the laboratory and sacrificed by a blow to the head. The skin mucus was immediately collected into a Petri dish from the whole body by scraping the surfaces with a plastic spatula. Then it was removed from the plate into a centrifuge tube with the aid of a small amount of phosphate-buffered saline (PBS), and was centrifuged twice at 12 000 × *g* (5 min at 4°C) to remove particulate and cellular debris. The protein concentration was determined using Bradford reagent (Sigma) and bovine serum albumin (BSA; Sigma) as a standard. Preparations were then adjusted to a protein concentration of 0.5 mg ml^{-1} in PBS. This mucus suspension was finally sterilized by UV light exposure for 30 min and stored in aliquots at –20°C until use.

Labelling of bacteria and cysts and adhesion assays

Bacteria and cysts of *Saprolegnia parasitica* were stained with the green fluorescent nucleic acid stain Syto 9 (Invitrogen) at a concentration of 1 µl per 10^9 bacteria in 1 ml and 1 µl per 10^5 cysts in 1 ml. After the stain had been added to the bacterial or cyst suspensions in sterile saline solution, the bacteria and cysts were pelleted by centrifugation at 10 500 × *g* (10 min) to remove the supernatant and resuspended in 1 ml of fresh saline solution. They were spectrophotometrically analysed in a Genios (Tecon) microplate reader (485 nm excitation, 535 nm emission).

Trout skin mucus preparations (25 µl) were diluted 1/10 (so that the final protein concentration was 0.05 mg ml^{-1}) and added in triplicate to a 96-well black polystyrene plate (Costar). Both male and female brown trout skin mucus was tested. As indicators of unspecific adhesion, BSA (0.05 mg ml^{-1}) and mucin from porcine stomach Type II (MPS; 0.05 mg ml^{-1}, Sigma) were used. Then, 75 µl of coating buffer (16.8 g sodium hydrogen carbonate, 21.2 g sodium carbonate per litre, pH 9.6) was added to each well and left overnight at 4°C. After washing with PBS-Tween 20 (0.1%), 25 µl of fluorescently labelled bacterial solution (10^9 bacterial cells ml^{-1}) was added to the coated wells and also to wells without coating, to test adhesion to polystyrene. Bacteria were forced to the bottom of the plate by centrifugation (163 × *g*, 12 s) and incubated for 30 min in the dark at room temperature, and then the fluorescence generated by labelled bacteria was recorded with a Genios (Tecon) microplate reader as described above. This was considered the measurement at time 0 (T0). After this, plates were washed with saline solution to remove non-attached bacteria, and the remaining liquid was removed by centrifugation of the plates upside down on an absorbent paper. A second spectrophotometrical measurement was done after adding 50 µl of saline solution to the wells. Adhesion was expressed as the percentage of fluorescence recovered in the second measurement relative to the fluorescence at T0. Binding of the mucus to the plate was confirmed by a lectin-binding assay as described by Neuhaus et al. (2007), using *Dolichos biflorus* lectin (DBA, Sigma).

For the adhesion assays with the cysts of *Saprolegnia parasitica*, the same 96-well black polystyrene plates coated with the skin mucus of male and female brown trout were used in triplicate. The steps followed in the assays were the same as those described above but using fluorescently stained cyst suspension instead of bacteria. Adhesion was expressed as the percentage of fluorescence of the bound cysts in the second measurement relative to the fluorescence of the cysts at T0.

Exclusion, competition and displacement tests

For these tests, non-stained bacteria were prepared at an initial concentration of 10^9 bacterial cells ml^{-1} in saline solution, and a further 7 serial 10-fold dilutions were done. The cysts were stained as described above, and the concentration used for the assays was 10^5 cysts ml^{-1}. The same 96-well plates were coated only with male trout mucus for these assays, as the incidence of saprolegniosis is higher in males (Aller-Gancedo & Fernández-Díez 1987). For the exclusion test, 25 µl of each dilution of the bacterial isolates was added to the wells and incubated for 30 min at room temperature. After a wash with saline solution to remove non-adhered cells, a 25 µl quantity of labelled cysts was added, and the plates were incubated for another 30 min at room temperature. For the competition test, 25 µl of each bacterial dilution and 25 µl of stained cysts were added simultaneously to the wells and incubated for 60 min at room temperature. For the displacement test, the labelled cyst suspension was first added to the wells and incubated for 30 min at room temperature. After a wash with saline solution to remove non-attached cysts, each dilution of the bacterial suspension was added and the plates were incubated for another 30 min at

Author copy

room temperature. After 60 min of incubation for each condition, plates were washed with saline solution and the adhesion ratio (%) was calculated as described above. As a control for each condition, wells with saline solution instead of bacterial cells were prepared. The percentage of cysts bound to these control wells was considered as the reference value (100%).

Statistical analysis

All results are shown as the average of at least 3 independent experiments; variation is expressed as standard deviation. A paired Student's *t*-test and a Student's *t*-test were used to determine whether the adhesion of bacteria to the various substrates tested differed significantly ($p < 0.05$). The Pearson correlation coefficient was calculated to determine any possible relationship between adhesion to polystyrene and to male skin mucus.

For the exclusion, competition and displacement tests, the differences in adhesion of the cysts to the skin mucus, with or without bacteria, were considered significant when $p < 0.05$ with the Student's *t*-test. All the statistics were calculated using SPSS for Windows version 16.0 and Microsoft Excel 2003.

RESULTS

Pathogenicity for rainbow trout

Results of both challenges performed are summarised in Table 1. In the first challenge with the 21 bacterial isolates, 15 were considered non-pathogenic for rainbow trout, as there was no mortality or signs of disease following the im or ip inoculation. These isolates belonged to the species *Aeromonas sobria* (3 isolates), *Pantoea agglomerans* (3), *Pseudomonas fluorescens* (5), *Serratia fonticola* (1), *Xanthomonas retroflexus* (1) and *Yersinia kristensenii* (2). The remaining bacterial isolates, *Aeromonas popoffii* (2) and *Aeromonas sobria* (4), caused 20 to 40% mortality and/or macroscopic lesions in internal organs, especially in the liver and spleen. All bacteria were recovered from the internal organs.

The 15 non-pathogenic isolates from the first challenge proved non-pathogenic again when challenged against rainbow trout for a second time. When the fish were sacrificed after 14 d, 7 out of the these 15 bacterial isolates were recovered once again in a small number of fish from the point of i.m. inoculation; with the exception of a single fish, no bacteria were re-isolated from internal organs (Table 1). None of these trout in which the inoculated bacteria were

Table 1. *Oncorhynchus mykiss*. Pathogenicity to rainbow trout of 21 bacterial isolates after intramuscular (i.m.) or intraperitoneal (i.p.) injection with 10^6 cells. Mortality and re-isolation of bacteria from trout show the results of the challenge in 10 (5 + 5) fish with the first 6 isolates and in 10 plus a further 40 (20 + 20) fish with the remaining 15 isolates

Species	Isolate	Mortality (%) i.m.	Mortality (%) i.p.	Gross lesions	Re-isolation of bacteria (% and tissue)
Aeromonas popoffii	LE 65	10	20	Yes	100 (liver, kidney, spleen)
Aeromonas popoffii	LE 69	0	20	No	20 (liver, kidney, spleen)
Aeromonas sobria	LE 17	20	20	Yes	50 (liver, kidney, spleen)
Aeromonas sobria	LE 68	0	30	No	30 (liver, kidney, spleen)
Aeromonas sobria	LE 100	0	30	No	30 (liver, kidney, spleen)
Aeromonas sobria	LE 104	0	30	Yes	10 (liver, kidney, spleen)
Aeromonas sobria	LE 51	0	0	No	0
Aeromonas sobria	LE 74	0	0	No	0
Aeromonas sobria	LE 76	0	0	No	0
Pantoea agglomerans	LE 35	0	0	No	0
Pantoea agglomerans	LE 36	0	0	No	0
Pantoea agglomerans	LE 37	0	0	No	45 (muscle)
Pseudomonas fluorescens	LE 89	0	0	No	0
Pseudomonas fluorescens	LE 98	0	0	No	10 (muscle)
Pseudomonas fluorescens	LE 122	0	0	No	0
Pseudomonas fluorescens	LE 141	0	0	No	15 (muscle)
Pseudomonas fluorescens	LE 143	0	0	No	40 (muscle)
Serratia fonticola	LE 52	0	0	No	10 (muscle)
Xanthomonas retroflexus	LE 38	0	0	No	30 (muscle), 5 (kidney)
Yersinia kristensenii	LE 54	0	0	No	0
Yersinia kristensenii	LE 58	0	0	No	10 (muscle)

Author copy

once again isolated showed signs of disease or macroscopically visible changes.

Adhesion assays

Adhesion of bacteria and *Saprolegnia parasitica* cysts to skin mucus

The results for the adhesion of bacteria to brown trout skin mucus are shown in Table 2. Adhesion to male brown trout skin mucus was low for the 15 bacterial isolates tested, ranging from 1.7% of the bacterial cells (*Aeromonas sobria* LE 76) to 15.3% (*Pseudomonas fluorescens* LE 141). The adhesion of bacteria to skin mucus of male brown trout was higher than the adhesion to female skin mucus (paired *t*-test, $p < 0.003$). However, adhesion to BSA and to MPS was similar to that observed on the skin mucus of male brown trout (paired *t*-test $p > 0.05$), and was statistically different in only 5 bacterial isolates between BSA and male skin mucus and in another 5 between MPS and male skin mucus (Student's *t*-test, $p < 0.05$). The adhesion to polystyrene was also similar to that measured on the skin mucus of male brown trout (paired *t*-test, $p > 0.05$), except *A. sobria* LE 51, which had a lower adhesion to polystyrene than male trout mucus, and *P. fluorescens* LE 141, which had a lower adhesion to polystyrene than both male and female trout mucus (Student's *t*-test, $p < 0.05$). A positive correlation between adhesion to male brown trout mucus preparations and polystyrene was detected (Pearson correlation coefficient, $r = 0.7408$; $p = 0.0014$, 1-tailed).

The adhesion of *Saprolegnia parasitica* cysts to the skin mucus of male brown trout was high (88.9 ± 6.8%) and greater than adhesion to female skin mucus (75.5 ± 7.5%). No significant differences were observed between adhesion of cysts to the skin mucus of male brown trout and the other substrates (Student's *t*-test, $p > 0.05$; Fig. 1).

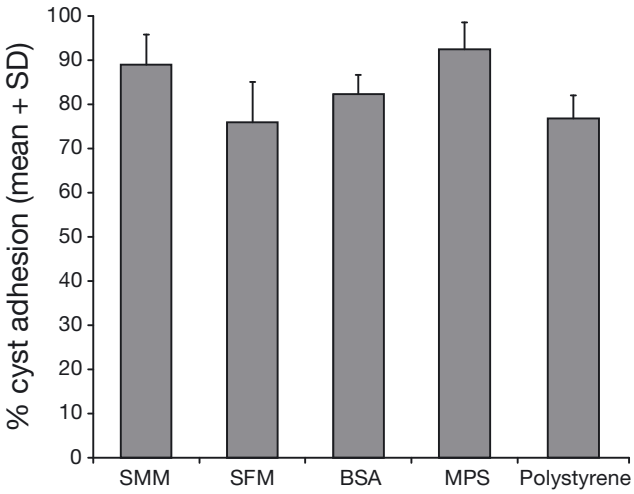


Fig. 1. *Saprolegnia parasitica.* Percentage of cysts (mean + SD of 3 experiments) adhering to the skin mucus of male (SMM) and female brown trout (SMF), to bovine serum albumin (BSA), mucin from porcine stomach (MPS) and polystyrene

Table 2. Percentage adhesion (mean ± SD of 3 experiments) by 15 bacterial isolates to the skin mucus of male (SMM) and female brown trout (SMF), and to bovine serum albumin (BSA), mucin from porcine stomach (MPS) and polystyrene. Values in **bold** indicate significant differences ($p < 0.05$) with greater adhesion of bacteria to SMM than to BSA, MPS, or polystyrene

Species	Isolate	% bacterial adhesion				
		SMM	SMF	BSA	MPS	Polystyrene
Aeromonas sobria	LE 51	2.02±1.22	1.63±0.20	**1.19±1.55**	6.82±0.98	**1.74±0.02**
Aeromonas sobria	LE 74	3.48±0.36	2.82±0.61	2.48±0.13	2.99±0.10	2.65±0.32
Aeromonas sobria	LE 76	1.66±0.55	1.36±2.04	1.61±0.27	8.55±0.11	1.45±0.12
Pantoea agglomerans	LE 35	9.99±0.92	7.55±2.32	9.86±0.09	7.98±0.12	11.35±0.06
Pantoea agglomerans	LE 36	4.59±0.17	3.65±0.52	**3.59±0.16**	**3.32±0.04**	3.92±0.22
Pantoea agglomerans	LE 37	2.28±0.19	2.07±0.25	**1.58±0.15**	**1.51±0.47**	2.51±0.13
Pseudomonas fluorescens	LE 89	2.89±0.19	3.01±0.71	2.80±1.37	2.56±1.05	3.62±0.11
Pseudomonas fluorescens	LE 98	2.95±1.06	2.56±0.39	3.66±0.36	2.75±0.18	3.14±0.02
Pseudomonas fluorescens	LE 122	3.99±0.54	2.59±0.37	**2.82±0.33**	**2.79±0.25**	3.83±0.08
Pseudomonas fluorescens	LE 141	15.27±1.06	13.26±0.23	**6.87±0.44**	**9.21±0.42**	**6.77±0.29**
Pseudomonas fluorescens	LE 143	3.01±0.67	1.99±0.43	2.13±0.19	1.9±0.17	1.59±0.01
Serratia fonticola	LE 52	4.15±0.96	3.43±0.25	4.86±0.24	3.99±0.37	4.51±0.22
Xanthomonas retroflexus	LE 38	3.01±0.55	2.27±0.40	1.83±0.13	2.19±0.59	2.68±0.02
Yersinia kristensenii	LE 54	4.71±0.53	3.43±1.12	3.6±0.09	2.79±0.50	4.89±0.09
Yersinia kristensenii	LE 58	3.47±1.04	2.84±1.04	2.72±0.73	**2.15±0.00**	4.17±0.52

Author copy

Exclusion, competition and displacement tests

The results of these tests are shown in Table 3. Under exclusion conditions (adding bacteria to skin mucus before cysts), the adhesion of *Saprolegnia parasitica* cysts was significantly reduced by 13 of the 15 bacterial isolates (Student's *t*-test, $p < 0.05$), but with different numbers of bacterial cells. Four of the bacterial isolates achieved this significant reduction of cyst adhesion up to the third dilution (2.5×10^7 bacteria), 4 up to the fourth (2.6×10^6 bacteria), 3 up to the fifth (2.5×10^5 bacteria) and 2 up to the sixth (2.5×10^4 bacteria). This last group of isolates belonged to the isolates *Aeromonas sobria* LE 76 and *Pseudomonas fluorescens* LE 141. Significant percent reductions in

Table 3. *Saprolegnia parasitica*. Percentage reduction of cyst adhesion to the skin mucus of male brown trout in the presence of different numbers of cells of 15 bacterial isolates under exclusion, competition and displacement conditions. Values in **bold** indicate the significant % reduction in the adhesion of *S. parasitica* cysts compared to controls (without bacteria) achieved by the minimum effective numbers of bacteria

Species	Isolate	No. of cells	% reduction of cyst adhesion		
			Exclusion	Competition	Displacement
Aeromonas sobria	LE 51	2.5×10^7	65.66	84.07	**9.63**
		2.5×10^6	31.81	79.35	8.07
		2.5×10^5	**14.12**	**61.13**	0.86
Aeromonas sobria	LE 74	2.5×10^7	64.15	83.61	20.45
		2.5×10^6	35.06	77.34	**16.05**
		2.5×10^5	**16.44**	73.61	8.62
		2.5×10^4	4.25	**36.13**	0
Aeromonas sobria	LE 76	2.5×10^7	78.25	88.03	28.16
		2.5×10^6	61.46	81.07	**21.17**
		2.5×10^5	34.84	81.88	15.79
		2.5×10^4	**13.74**	**72.83**	9.36
Pantoea agglomerans	LE 35	2.5×10^7	5.98	69.86	13.94
		2.5×10^6	3.67	32.94	8.78
		2.5×10^5	2	**7.42**	8.40
Pantoea agglomerans	LE 36	2.5×10^7	**13.91**	60.97	**8.47**
		2.5×10^6	0	**55.67**	0
Pantoea agglomerans	LE 37	2.5×10^7	8.80	63.55	6.17
		2.5×10^6	3.75	**57.30**	3.53
Pseudomonas fluorescens	LE 89	2.5×10^7	35.53	77.87	**20.24**
		2.5×10^6	15.76	**56.15**	9.98
		2.5×10^5	**10.21**	13.85	10.30
Pseudomonas fluorescens	LE 98	2.5×10^7	10.64	**73.66**	5.00
		2.5×10^6	**10.63**	48.96	0.34
Pseudomonas fluorescens	LE 122	2.5×10^7	51.90	42.94	**5.24**
		2.5×10^6	**31.79**	**37.56**	0
Pseudomonas fluorescens	LE 141	2.5×10^7	42.08	83.80	13.83
		2.5×10^6	37.93	72.37	8.68
		2.5×10^5	36.17	**32.23**	0
		2.5×10^4	**10.27**	7.78	6.09
Pseudomonas fluorescens	LE 143	2.5×10^7	32.67	75.67	0.87
		2.5×10^6	**14.05**	63.55	0
		2.5×10^5	6.41	**36.14**	0
Serratia fonticola	LE 52	2.5×10^7	**8.50**	56.71	7.46
		2.5×10^6	4.61	**39.64**	0
Xanthomonas retroflexus	LE 38	2.5×10^7	**19.72**	83.35	**10.97**
		2.5×10^6	7.71	74.51	10.27
		2.5×10^5	12.48	**44.18**	7.76
Yersinia kristensenii	LE 54	2.5×10^7	20.13	52.59	**9.37**
		2.5×10^6	**13.56**	**49.78**	5.92
Yersinia kristensenii	LE 58	2.5×10^7	**15.00**	50.68	4.89
		2.5×10^6	5.60	**36.06**	0

Author copy

the adhesion of *S. parasitica* cysts ranged between 78.25 and 8.5%.

In the competition tests (adding bacteria and cysts simultaneously to the mucus), the adhesion of the cysts was significantly reduced by all bacterial isolates tested (Student's *t*-test, $p < 0.05$), differing again in the number of cells to achieve this. One of the bacterial isolates reduced this adhesion up to the third dilution (2.5×10^7 bacteria), 7 did so up to the fourth (2.5×10^6 bacteria), 5 up to the fifth (2.5×10^5 bacteria) and 2 up to the sixth (2.5×10^4 bacteria). These last 2 isolates were *Aeromonas sobria* LE 74 and LE 76. Significant percent reductions in the adhesion of *Saprolegnia parasitica* cysts ranged between 88.03 and 7.42%.

In the displacement tests (adding cysts to the mucus and then bacteria), only 8 of the 15 isolates tested were able to significantly reduce the adhesion of cysts to skin mucus (Student's *t*-test, $p < 0.05$). Six of them achieved it up to the third dilution (2.5×10^7 bacteria) and 2 up to the fourth (2.5×10^6 bacteria). These latter isolates were again *Aeromonas sobria* LE 74 and LE 76. Significant percent reductions in the adhesion of *Saprolegnia parasitica* cysts ranged between 28.16 and 5.24%. Fig. 2 shows the percentage reduction of *S. parasitica* cyst adhesion achieved by the best 4 of the 15 bacterial isolates in all the conditions tested.

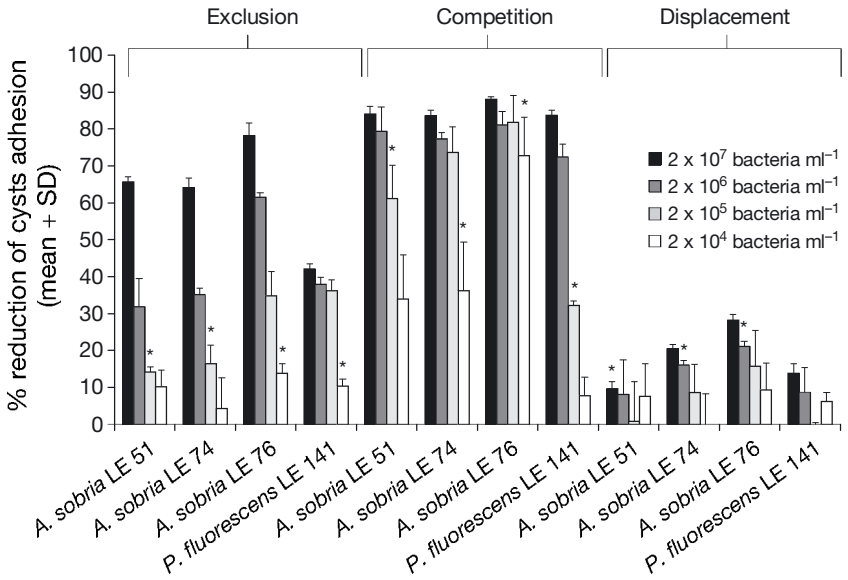


Fig. 2. *Saprolegnia parasitica.* Percentage reduction of cyst adhesion (mean + SD of 3 experiments) to the skin mucus of male brown trout, in the presence of the best 4 of 15 bacterial isolates, in at least 2 of the 3 conditions tested (exclusion, competition and displacement); results are relative to the adhesion of cysts in the controls (with no bacteria). *Indicate the minimum numbers of bacteria which significantly reduced the adhesion of *S. parasitica* cysts

DISCUSSION

A high proportion of the bacteria tested (15 out of 21) did not adversely affect rainbow trout. The isolates with pathogenic effects belonged to *Aeromonas sobria* and *A. popoffii* and caused lesions in internal organs and/or mortality. *A. popoffii* does not appear to have been described as pathogenic for fish, although some virulence factors have been reported (Soler et al. 2002). In contrast, certain isolates of *A. sobria* have been described as causing disease in fish such as gizzard shad *Dorosoma cepedianum* and perch *Perca fluviatilis* (Austin & Austin 2007).

In contrast to the pathogenic *Aeromonas sobria* isolates tested in this study, other isolates of this species were not pathogenic for rainbow trout, nor were those belonging to the species *Pantoea agglomerans, Pseudomonas fluorescens, Serratia fonticola, Xanthomonas retroflexus* and *Yersinia kristensenii*. However other authors have found pathogenic strains of *P. agglomerans* and *P. fluorescens* (Bly et al. 1997, Austin & Austin 2007).

The absence of pathogenicity of certain bacterial isolates belonging to species that cause diseases in fish, as well as their usefulness as probiotics against several pathogens, has been previously demonstrated in rainbow trout. For example, Irianto & Austin (2002) did so with an *Aeromonas hydrophila* isolate against furunculosis, and Brunt & Austin (2005) and Brunt et al. (2007) assessed the effectiveness of an *A. sobria* isolate to control several diseases, including lactococcosis, streptococcosis and furunculosis. However, it may become necessary to assess whether the 15 bacteria that were not pathogenic for rainbow trout would be equally benign against other fish species, particularly other salmonids, if they were intended to be used for biological control.

The adhesion of bacteria to the skin mucus of fish is a desirable characteristic if they are to be used in biological control of a disease (Chabrillón et al. 2005). In the present study, the adhesion to the skin mucus of brown trout of the bacteria tested was low, with percentages of adhesion not higher than 15.3%. The most adhesive isolate was *Pseudomonas fluorescens* LE 141, followed by *Pantoea*

Author copy

agglomerans LE 35. The limited adhesion of bacteria to fish mucus is in agreement with the results of previous studies (Chabrillón et al. 2005, 2006, Balcázar et al. 2007), with adhesion being lower on skin mucus than on gut mucus of rainbow trout and other fish species on some occasions (Chabrillón et al. 2006, Balcázar et al. 2007, 2008). We observed that there was greater adhesion of bacteria to the skin mucus of male than of female brown trout, and this may have implications for the future treatment of fish with inhibitory bacteria against *Saprolegnia parasitica*. Thus, female trout would need to be treated with higher concentrations of bacteria.

The non-specific binding of bacteria can be measured by testing their adhesion to BSA because, as Ouwehand et al. (2003) stated, it is unlikely that bacteria develop a specific affinity for this protein. In our study, the adhesion of bacteria to the skin mucus of male trout was in general not higher than to BSA. This is in agreement with Balcázar et al. (2007, 2008), who found differences only between adhesion to intestinal mucus of rainbow trout and to BSA, but not using skin mucus; in contrast, Nikoskelainen et al. (2001) found differences in the adhesion between rainbow trout mucus of both origins and BSA.

We found that the adhesion of bacteria to MPS was generally lower than the adhesion to male brown trout skin mucus. This suggests that the adhesion of bacteria to mucus has no host specificity and depends more on the bacterial isolate than on the kind of mucus tested. The lack of host specificity was also observed by other authors (Nikoskelainen et al. 2001, Rinkinen et al. 2003, Chabrillón et al. 2005, 2006), although it would be a desirable characteristic in any bacteria to be used in biological control (Rinkinen et al. 2003, Chabrillón et al. 2005).

Adhesion to polystyrene was found to be generally similar to that observed to skin mucus of male trout in this study, as also shown elsewhere (Nikoskelainen et al. 2001, Balcázar et al. 2007). The strong adhesion of bacteria to polystyrene has been related to hydrophobic interactions (Balcázar et al. 2007, 2008), and some authors have reported that strong hydrophobicity is an indicator of good binding ability (Wadstroum et al. 1987, Balcázar et al. 2007, Pérez-Sánchez et al. 2011). In our study, a correlation between adhesion to polystyrene and to the skin mucus of trout was found, opposite to the results of Balcázar et al. (2007). However, Ouwehand et al. (1999) stated that there was no relationship between a strong capacity for adhesion and hydrophobic interactions. Another indicator of good binding ability of bacteria could be auto-aggregation (Collado et al. 2008).

In the present study, a new technique to study the adhesion of cysts of *Saprolegnia parasitica* to skin mucus of trout and also the ability of bacteria to reduce this adhesion under different conditions has been described. The strong binding of *S. parasitica* cysts to the skin mucus of brown trout might be due to the presence of hooked hairs in bundles, which has been considered as an adaptation of the most pathogenic strains in order to achieve attachment to the host (Pickering & Willoughby 1982, Beakes 1983), although we have not found differences between the adhesion of *S. parasitica* and *S. diclina* isolates to skin mucus (data not shown), so other factors such as the glycoproteins surrounding the spines may also be involved in the attachment (Burr & Beakes 1994). The adhesion of cysts was higher to the skin mucus of male brown trout than to the skin mucus of females. This may be related to the higher incidence of saprolegniosis in male trout found by other authors (Aller-Gancedo & Fernández-Díez 1987). Another hypothesis to explain the greater predisposition of male brown trout to become infected is the smaller amount of mucus on the skin of males, which Pickering (1977) associated with their higher plasmatic levels of androgens and which might reduce the level of protection from the skin.

The ability of bacteria to reduce the adhesion of cysts to the skin mucus of trout varied in accordance with the conditions of the experiment. In competition and exclusion tests, all, or nearly all, of the isolates succeeded in impeding to some extent the binding of *Saprolegnia parasitica*. However, only half of the bacterial isolates managed to displace the cysts from skin mucus, and, even among these, higher bacterial concentrations were needed for this effect. This may be because of the strong ability of the *S. parasitica* cysts to adhere, which makes it difficult to displace them once they are attached. Other authors have performed similar assays on skin and gut mucus of different fish species, but with bacterial pathogens, and obtained different results (Vine et al. 2004, Chabrillón et al. 2005, 2006, Balcázar et al. 2007, 2008, Sica et al. 2012).

The bacterial isolates which most effectively reduced the adhesion of *Saprolegnia parasitica* cysts to the skin mucus of male brown trout were those belonging to the species *Aeromonas sobria*, followed by some *Pseudomonas fluorescens* isolates. The *P. fluorescens* LE 141 isolate, which was the most adhesive to the skin mucus of trout, achieved considerable exclusion and competition of binding by cysts, but it did not displace them from the mucus.

Author copy

The bacterial isolates used in this study that were not pathogenic for trout and had a strong ability to reduce the adhesion of *Saprolegnia parasitica* cysts to skin mucus might be good candidates for use in the biological control of saprolegniosis. Further studies are needed to determine the *in vivo* inhibitory effect of these bacteria against saprolegniosis that has been predicted by previous studies.

Acknowledgements. This work formed part of research project AGL2006-03374/ACU financed by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia and the European Regional Development Fund, and research project AGL 2009-10151, financed by the Ministerio de Educación y Ciencia. M.T.C.-G. was supported by a fellowship from the Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León, co-financed by the European Social Fund. We thank the Servicio Territorial de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León for help in the collection of brown trout from the Vegas del Condado hatchery, and the 'Los Leoneses' fish farm at Castrillo del Condado in the Province of León for providing the rainbow trout. We also thank Prof. Dr. D. Steinhagen (University of Veterinary Medicine, Hannover) and his research team for their help with the techniques related to adhesion assays with Syto 9.

LITERATURE CITED

Aller-Gancedo JM, Fernández-Díez M (1987) Saprolegniosis en la trucha común (*Salmo trutta*) de los ríos de León (España). Med Vet 4:181–184

Austin B, Austin DA (2007) Bacterial fish pathogens. Diseases of farmed and wild fish, 4th edn. Praxis Publishing, Chichester

Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Girones O, Múzquiz JL (2007) *In vitro* competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. Vet Microbiol 122:373–380

Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Múzquiz JL, Girones O (2008) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture 278:188–191

Beakes GW (1983) A comparative account of cyst coat ontogeny in saprophytic and fish-lesion (pathogenic) isolates of the *Saprolegnia diclina-parasitica* complex. Can J Bot 61:603–625

Bly JE, Quiniou SMA, Lawson LA, Clem LW (1997) Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens.* J Fish Dis 20:35–40

Brunt J, Austin B (2005) Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis 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). J Fish Dis 30:573–579

Burr AW, Beakes GW (1994) Characterization of zoospore and cyst surface structure in saprophytic and fish pathogenic *Saprolegnia* species (oomycete fungal protists). Protoplasma 181:142–163

Carbajal-González MT, Fregeneda-Grandes JM, Suárez-Ramos S, Rodríguez Cadenas F, Aller-Gancedo JM (2011) Bacterial skin flora variation and *in vitro* inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* in brown trout and rainbow trout. Dis Aquat Org 96:125–135

Chabrillón M, Rico RM, Balebona MC, Moriñigo MA (2005) Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida.* J Fish Dis 28:229–237

Chabrillón M, Ouwehand AC, Díaz-Rosales P, Arijo S, Martínez-Manzanares E, Balebona MC, Moriñigo MA (2006) Adhesion of lactic acid bacteria to mucus of farmed gilthead seabream, and interactions with fish pathogenic microorganisms. Bull Eur Assoc Fish Pathol 26:202–210

Collado MC, Meriluoto J, Salminen S (2008) Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. Eur Food Res Technol 226:1065–1073

Fregeneda-Grandes JM, Fernández-Díez M, Aller-Gancedo JM (2000) Ultrastructural analysis of *Saprolegnia* secondary zoospore cyst ornamentation from infected wild brown trout, *Salmo trutta* L., and river water indicates two distinct morphotypes amongst long-spined isolates. J Fish Dis 23:147–160

Hatai K, Willoughby LG (1988) *Saprolegnia parasitica* from rainbow trout inhibited by the bacterium *Pseudomonas fluorescens.* Bull Eur Assoc Fish Pathol 8:27–29

Hussein MA, Hatai K (2001) *In vitro* inhibition of *Saprolegnia* by bacteria isolated from lesions of salmonids with saprolegniasis. Fish Pathol 36:73–78

Irianto A, Austin B (2002) Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis 25:333–342

Khosravi AR, Shokri H, Sharifrohani M, Mousavi HE, Moosavi Z (2012) Evaluation of the antifungal activity of *Zataria multiflora, Geranium herbarium*, and *Eucalyptus camaldolensis* essential oils on *Saprolegnia parasitica*-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. Foodborne Pathog Dis 9:674–679

Lategan MJ, Gibson LF (2003) Antagonistic activity of *Aeromonas media* strain A199 against *Saprolegnia* sp., an opportunistic pathogen of the eel, *Anguilla australis* Richardson. J Fish Dis 26:147–153

Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, Tarsi R, Miliani M, Gabbanelli F, Cartolari M (2001) Fungistatic activity of modified chitosans against *Saprolegnia parasitica.* Biomacromolecules 2:165–169

Neuhaus H, van der Marel M, Caspari N, Meyer W, Enss ML, Steinhagen D (2007) Biochemical and histochemical study on the intestinal mucosa of the common carp *Cyprinus carpio* L., with special consideration of mucin glycoproteins. J Fish Biol 70:1523–1534

Nikoskelainen S, Salminen S, Bylund G, Ouwehand AC (2001) Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. Appl Environ Microbiol 67:2430–2435

Nurhajati J, Atira, Aryantha INP, Kadek Indah DG (2012) The curative action of *Lactobacillus plantarum* FNCC 226 to *Saprolegnia parasitica* A3 on catfish (*Pangasius hypophthalamus* Sauvage). Int Food Res J 19: 1723–1727

Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Grönlund MM, Isolauri E, Salminen SJ (1999) Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. Int Dairy J 9:623–630

Author copy

Ouwehand AC, Båtsman A, Salminen S (2003) Probiotics for the skin: a new area of potential application? Lett Appl Microbiol 36:327–331

Pérez-Sánchez T, Balcázar JL, García Y, Halaihel N and others (2011) Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae.* J Fish Dis 34:499–507

Pickering AD (1977) Seasonal changes in the epidermis of the brown trout, *Salmo trutta* (L.). J Fish Biol 10:561–566

Pickering AD, Willoughby LG (1982) *Saprolegnia* infections of salmonid fish. In: Roberts RJ (ed) Microbial diseases of fish. Academic Press, London, p 271–297

Ran C, Carrias A, Williams MA, Capps N and others (2012) Identification of *Bacillus* strains for biological control of catfish pathogens. PLoS ONE 7:e45793

Rinkinen M, Westermarck E, Salminen S, Ouwehand AC (2003) Absence of host specificity for *in vitro* adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. Vet Microbiol 97:55–61

Sica MG, Brugnoni LI, Marucci PL, Cubitto MA (2012) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming. Ant Leeuwenhoek 101:869–879

Soler L, Figueras MJ, Chacón MR, Vila J, Marco F, Martínez-Murcia AJ, Guarro J (2002) Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. FEMS Immunol Med Microbiol 32 (3): 243-247

Vine NG, Leukes WD, Kaiser H, Daya S, Baxter J, Hecht T (2004) Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. J Fish Dis 27:319–326

Wadstroum T, Andersson K, Sydow M, Axelsson L, Lindgren S, Gullmar B (1987) Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. J Appl Microbiol 62:513–520

Zhang SJ, Yang XL, Li D, Li Y, Gao P (2008) Screening of antagonistic bacterium strain against saprolegniosis and the preliminary study of *in vitro* antagonistic activity. Acta Hydrobiol Sin 32:301–307

Editorial responsibility: David Bruno, Aberdeen, UK

Submitted: August 1, 2012; Accepted: January 29, 2013
Proofs received from author(s): March 31, 2013

Bibliografía

ABO-ELNAGA, I. G. (1980). The bacterial flora of some freshwater-fishes. *Archiv für Lebensmittelhygiene, 31*: 153-188

ABHINANDAN, D., YASUYUKI, H. y TAHARA, S. (2008). Antagonistic effects of *Pseudomonas jessenii* against *Pythium aphanidermatum*: morphological, ultrastructural and cytochemical aspects. *J Basic Microbiol, 48*: 71-81

ACUFF, G., IZAT, A. L. y FINNE, G. (1984). Microbial flora of pond-reared tilapia (*Tilapia aurea*) held on ice. *J Food Protect, 47:* 778-780

AL-HARBI, A. H. y UDDIN, M. N. (2004). Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) cultured in eathern ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture, 229*: 37-44

ALLER-GANCEDO, J. M. (1988[a]). Epidemiology of saprolegniosis in salmonid fish. En TORRES RODRÍGUEZ, J.M. *Proceedings of the Tenth Congress of the Society for Human and Animal Mycology-ISHAM*, pp. 318-322. J.R. Prous Science, Barcelona

ALLER-GANCEDO, J. M. (1988[b]). Saprolegniosis, with special reference to salmonid fish. *Pro-Veterinario*, *8*: 9-12

ALLER-GANCEDO, J. M. y FERNÁNDEZ DÍEZ, M. (1984). Saprolegniosis en la trucha (*Salmo trutta*) de los ríos de la provincia de León. *II Reunión Conjunta de Micología, A.E.E.M. y S.E.M.*, *116*. Barcelona

ALLER-GANCEDO, J. M. y FERNÁNDEZ DÍEZ, M. (1987). Saprolegniosis en la trucha común (*Salmo trutta*) de los ríos de León (España). *Medicina Veterinaria, 4*: 181-184

ALLER-GANCEDO, J. M., FREGENEDA-GRANDES, J. M. y FERNÁNDEZ DÍEZ, M. (1999). A method for maintaining stock cultures of *Saprolegnia*. *9th Internacional Conference of the EAFP. Rhodes, Greece. 19-24 September 1999*, p.225

ÁLVAREZ, F. (1992). Inmunobiología de salmónidos. Análisis morfológico de los mecanismos de defensa de *Salmo trutta* contra la infección por *Saprolegnia* sp. Estudio del tegumento y los órganos linfoides. Tesis Doctoral. Universidad de León, León, España

ALY, S. M., ABD-EL-RAHMAN, A. M., JOHN, G., MOHAMED, M. F. (2008). Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture, 277:* 1-6

ANDERSSON, M. G. y CERENIUS, L. (2002). Pumilio Homologue from *Saprolegnia parasitica* specifically expressed in undifferentiated spore cysts. *Eukariotic Cell, 1*: 105-111

AUSTIN, B. (1983). Bacterial microflora associated with a coastal, marine fish rearing unit. *J Marine Biology, 63*: 585-592

AUSTIN, B. (2006). The bacterial microflora of fish, revised. *Sci World J, 6*: 931-945

AUSTIN, B. y AUSTIN, D. A. (2007). Bacterial Fish Pathogens. *Diseases of farmed and wild fish*. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK. Cuarta edición

BALCÁZAR, J. L., DE BLAS, I., RUIZ-ZARZUELA, I., CUNNINGHAM, D. VENDRELL, D. y MÚZQUIZ, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol, 114*: 173-186

BALCÁZAR, J. L., VENDRELL, D., DE BLAS, I., RUIZ-ZARZUELA, I., GIRONES, O. y MÚZQUIZ, J. L. (2007). *In vitro* competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. *Vet Microbiol, 122*: 373-380

BALCÁZAR, J. L., VENDRELL, D., DE BLAS, I., RUIZ-ZARZUELA, I., MÚZQUIZ, J. L. y GIRONES, O. (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture, 278*: 188-191

BEAZ-HIDALGO, R., ALPERI, A., FIGUERAS, M. J., ROMALDE, J. L. (2009). *Aeromonas piscicola* sp. nov. isolated from diseased fish. *Syst Appl Microbiol, 32*: 491-499

BLY, J. E., QUINIOU, S. M.-A. y CLEM, L. W. (1997). Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. *J Fish Dis, 20*: 35-40

BOSSHARD, P. P., ZBINDEN, R., ABELS, S., BÖDDINGHAUS, B., ALTWEGG, M.,† Y BÖTTGER, E. C. (2006). 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE System and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol, 44*: 1359-1366

BRUNO, D. W. y WOOD, B. P. (1999). *Saprolegnia* and other *Oomycetes*. En: Woo, P. T. K. y Bruno, D. W., *Fish diseases and disorders*. Vol.3 Viral, bacterial and fungal infections. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 599-659

BRUNO, D., VAN WEST, P. y BEAKES, G. (2010). *Saprolegnia* and other Oomycetes. En: Bruno, D. W. y Woo, P. T. K., *Fish Diseases and Disorders.* Vol.3 Viral, bacterial and fungal infections. 2nd edn. CABI International, pp. 669-720

BRUNT, J. y AUSTIN, B. (2005). Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis, 28*: 693-701

BRUNT, J., NEWAJ-FYZUL, A. y AUSTIN, B. (2007). The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis, 30*: 573-579

BURR, A. W. y BEAKES, G. W. (1994). Characterization of zoospore and cyst surface structure in saprophytic and fish pathogenic *Saprolegnia* species (*Oomycete* fungal protists). *Protoplasma, 181*: 142-163

CHABRILLÓN, M., RICO, R. M., BALEBONA, M. C. y MORIÑIGO, M. A. (2005). Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*. *J Fish Dis, 28*: 229-237

CHABRILLÓN, M., OUWEHAND, A. C., DÍAZ-ROSALES, P., ARIJO, S., MARTÍNEZ-MANZANARES, E, BALEBONA, M. C., y MORIÑIGO, M. A. (2006). Adhesion of lactic acid bacteria to mucus of farmed gilthead seabream, and interactions with fish pathogenic microorganisms. *Bull Eur Ass Fish Pathol, 26*: 202-210

COHEN, P. S. y LAUX, D. C. (1995). Bacterial adhesion to and penetration of intestinal mucus *in Vitro. Method Enzymol, 253*: 309-314

COLLADO, M. C., MERILUOTO, J. y SALMINEN, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur Food Res Technol, 226*: 1065-1073

CROSS, M. L. y WILLOUGHBY, L. G. (1989). Enhanced vulnerability of rainbow trout (*Salmo gairdnery*) to *Saprolegnia* infection, following treatment of the fish with an androgen. *Mycol Res, 93*: 379-402

DE BRUIJN, I., BELMONTE, R., ANDERSON, V. L., SARAIVA, M., WANG, T., VAN WEST, P. y SECOMBES, C. J. (2012). Immune gene expression in trout cell lines infected with the fish pathogenic oomycete *Saprolegnia parasitica. Dev Comp Immunol, 38:* 44-54

DE LEÓN FAJARDO, L. R. y MARTH, E. (1979). Bacterial flora of fish from tropical sea water. *J Food Protect*, *42:* 724-728

DEORA, A., HASHIDOKO, Y. y TAHARA, S. (2008). Antagonistic effects of *Pseudomonas jessenii* against *Pythium aphanidermatum*: morphological, ultrastructural and cytochemical aspects. *J Bas Microbiol, 48*: 71-81

DE SOUSA, J. A. y SILVA-SOUZA, Â.T. (2001). Bacterial community associated with fish and water from Congonhas River, Sertaneja, Paraná, Brazil *Braz Arch Biol Techn, 44*: 373-381

DIÉGUEZ-URIBEONDO, J., CERENIUS, L. y SÖDERHÄLL, K. (1994). *Saprolegnia parasitica* and its virulence on three different species of crayfish. *Aquaculture, 120*: 219–228

DIÉGUEZ-URIBEONDO, J., FREGENEDA-GRANDES, J. M., CERENIUS, L., PÉREZ-INIESTA, E., ALLER-GANCEDO, J. M., TELLERÍA, M. T., SÖDERHÄLL, K. y MARTÍN, M. P. (2007). Re-evaluation of the enigmatic species complex *Saprolegnia diclina–Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data. *Fungal Genet Biol, 44*: 585-601

DILER, O., ALTUN, S., ÇALIKUŞU, F y DILER, A (2000). A study on qualitative and quantitative bacterial flora of the Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) living in different fish farms. *Turk J Vet Anim Sci*, *24*: 251-259

FERNÁNDEZ-BENÉITEZ, M. J., ORTIZ-SANTALIESTRA, M. E., LIZANA, M. y DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. (2008). *Saprolegnia diclina*: another species responsible for the emergent disease "*Saprolegnia* infections" in amphibians. *FEMS Microbiol Lett, 279:* 23-29

FJELLHEIM, A. J., KLINKENBERG, G., SKJERMO, J., AASEN, I. M., VADSTEIN, O. (2010). Selection of candidate probionts by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Vet. Microbiol, 144*: 153-159

FREGENEDA-GRANDES, J. M. (1998). Presencia de *Saprolegnia* en el agua del río Luna (León). Características ultraestructurales y patogenicidad experimental para la trucha arco-iris (Oncorhynchus mykiss) de las cepas potencialmente patógenas. Tesis Doctoral. Universidad de León, León, España

FREGENEDA-GRANDES, J. M., FERNÁNDEZ DÍEZ, M. y ALLER-GANCEDO, J. M. (2000). Ultrastructural analysis of *Saprolegnia* secondary zoospore cyst ornamentation from infected wild brown trout, *Salmo trutta* L., and river water indicates two distinct morphotypes amongst long-spined isolates. *J Fish Dis, 23*: 147-160

FREGENEDA-GRANDES, J. M., FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. y ALLER-GANCEDO, J. M. (2001). Experimental pathogenicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), of two distinct morphotypes of long-spined *Saprolegnia* isolates obtained from wild brown trout, *Salmo trutta* L., and river water. *J Fish Dis, 24*: 351-359

FREGENEDA-GRANDES, J. M., RODRÍGUEZ-CADENAS, F., CARBAJAL-GONZÁLEZ, M. T. y ALLER-GANCEDO, J. M. (2007). Antibody response of brown trout *Salmo trutta* injected with pathogenic *Saprolegnia parasitica* antigenic extracts. *Dis Aquat Org, 74*: 107-111

FREGENEDA-GRANDES, J. M., CARBAJAL-GONZÁLEZ, M. T. y ALLER-GANCEDO, J. M. (2009). Prevalence of serum antibodies against *Saprolegnia parasitica* in wild and farmed brown trout *Salmo trutta*. *Dis Aquat Org, 83*: 17-22

FORNERIS, G., BELLARDI, S., PALMEGIANO, G. B., SAROGLIA, M., SICURO, B., GASCO, L. y ZOCCARATO, I. (2003). The use of ozone in trout hatchery to reduce saprolegniasis incidence. *Aquaculture, 221*: 157-166

GATESOUPE, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture, 180*: 147-165

GEORGALA, D. L. (1958). The bacterial flora of the skin of North Sea Cod. *J Gen Microbiol, 18*: 84-91

GIESEKER, G. M., SERFING, S. G. y REIMSCHUESSEL, R. (2006). Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture, 253*: 120-129

GOLDSCHMIDT-CLERMONT, E., WAHLI, T., FREY, J y BURR, S. E. (2008). Identification of bacteria from the normal flora of perch, *Perca fluviatilis* L., and evaluation of their inhibitory potential towards *Aeromonas* species. *J Fish Dis., 31*: 353-359

GONZÁLEZ, C. J., LÓPEZ-DÍAZ, T. M., GARCÍA-LÓPEZ, M. L., PRIETO, M. y OTERO, A. (1999). Bacterial microflora of wild brown trout

(*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*), and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Food Protect, 62*: 1270-1277

GONZÁLEZ, C. J., SANTOS, J. A., GARCÍA-LÓPEZ, M. L. y OTERO, A. (2000). Psychrobacters and related bacteria in freshwater fish. *J Food Protect, 63*: 315-321

GONZÁLEZ, C. J., SANTOS, J. A., GARCÍA-LÓPEZ, M. L., GONZÁLEZ, N. y OTERO, A. (2001). Mesophilic Aeromonads in wild and aquacultured freshwater fish. *J Food Protect*, *64*: 687-691

HARRIS, N. R., JAMES, T. Y., LAUER, A., SIMON, N. A., PATEL, A. (2006). Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. *Ecohealth, 3:* 53-56

HATAI, K. y HOSHIAI, G. (1994). Pathogenicity of *Saprolegnia parasitica* Coker. En MUELLER, G.J. *Salmon saprolegniasis*, pp. 87-98. U.S. Department of Energy, Bonneville Power Administration, Portland, OR, USA

HATAI, K. y WILLOUGHBY, L. G. (1988). *Saprolegnia parasitica* from rainbow trout inhibited by a bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Bull Eur Assoc Fish Path, 8*: 27-29

HJELM, M., BERGH, Ø., RIAZA, A., NIELSEN, J., MELCHIORSEN, J., JENSEN, S., DUNCAN, H., AHRENS, P., BIRKBECK, H. y GRAM, L. (2004). Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *System Appl Microbiol, 27*: 360–371

HODKINSON, M. y HUNTER, A. (1970). Immune response of UDN infected salmon to *Saprolegnia*. *J Fish Biol, 2*: 305-311

HORSLEY, R. W. (1973). Bacterial flora of Atlantic salmon (*Salmo Salar* L) in relation to its environment. *J Appl Microbiol, 36*: 377-386

HOVDA, M. B., LUNESTAD, B. T., FONTANILLAS, R. y ROSNES, J. T. (2007). Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture, 272*: 581-588

HOWELL, C. R. y STIPANOVIC, R. D. (1980). Supression of *Pythium ultimatum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathol, 70*: 712-715

HUBER, I., SPANGGAARD, B., APPEL, K. F., ROSSEN, L., NIELSEN, T. y GRAM, L. (2004). Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J Appl Microbiol, 96*: 117-132

HUSSEIN, M. A. y HATAI, K. (2001). *In vitro* inhibition of *Saprolegnia* by bacteria isolated from lesions of salmonids with saprolegniasis. *Fish Pathol, 36*: 73-78

IRIANTO, A. y AUSTIN, B. (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis, 25*: 333-342

IZVEKOVA, G. I., IZVEKOV, E. I. y PLOTNIKOV, A. O. (2007). Symbiotic microflora in fishes of different ecological groups. *Ecology, 34*: 610-618

JENSEN, S., BERGH, Ø., ENGER, Ø. y HJELTNES, B. (2002). Use of PCR-RFLP for genotyping 16S rRNA and characterizing bacteria cultured from halibut fry. *Can J Microbiol, 48*: 379-386

JIN, L. Z., HO, Y. W., ALI, M. A., ABDULLAH, N. y JALALUDIN, S. (1996). Effect of adherent *Lactobacillus* spp. on *in vitro* adherence of Salmonellae to the intestinal epithelial cells of chicken. *J Appl Bacteriol, 81*: 201-206

KALES, S. C., DEWITTE-ORR, S. J., BOLS, N. C. y DIXON, B. (2007). Response of the rainbow trout monocyte/macrophage cell line, RTS11 to the water molds *Achlya* and *Saprolegnia. Mol Immunol, 44*: 2303-2314

KESARCODI-WATSON, A., KASPAR H., LATEGAN, M. J. y GIBSON, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture, 274*: 1-14

KHOMVILAI, C., KARITA, S., KASHIWAGI, M. y YOSHIOKA, M. (2005). Fungicidal effects of sodium hypochlorite solution on *Saprolegnia* isolated from eggs of chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Fisheries Sci, 71*: 1188-1190

KHOSRAVI, A. R., SHOKRI, H., SHARIFROHANI, M., MOUSAVI, H. E. y MOOSAVI, Z. (2012). Evaluation of the antifungal activity of *Zataria multiflora*, *Geranium herbarium*, and *Eucalyptus camaldolensis* essential oils on *Saprolegnia parasitica*-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Foodborne Pathog Dis,9*: 674-679

KIESEKER, J. M., BLAUSTEIN, A. R. y BELDEN, L. K. (2001). Complex causes of amphibian population declines. *Nature, 410:* 681-684

KIM, D. H., BRUNT, J. y AUSTIN, B. (2007). Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Appl Microbiol, 102*: 1654-1664

KIRK, P. M., CANNON, P. F. MINTER, D. W. y STALPERS, J. A. (2008). Ainsworth y Bisby's Dictionary of the Fungi. CAB INTERNATIONAL. Wallingford. Oxon OX 10 8DE. UK

KITAMURA, E., MYOUGA, H. y KAMEI, Y. (2002). Polysaccharolytic activities of bacterial enzymes that degrade the cell walls of *Pythium porphyrae*, a causative fungus of red rot disease in *Porphyra yezoensis*. *Fisheries Sci, 68*: 436-445

KORKEA-AHO, T.L., HEIKKINEN, J., THOMPSON, K.D., VON WRIGHT, A. y AUSTIN, B. (2011). *Pseudomonas* sp. M174 inhibits the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *J Appl Microbiol, 111*: 266-277

LATEGAN, M. J. y GIBSON, L. F. (2003). Antagonistic activity of *Aeromonas media* strain A199 against *Saprolegnia* sp., an opportunistic pathogen of the eel, *Anguilla australis* Richardson. *J Fish Dis, 26*: 147-153

LATEGAN, M. J., BOOTH, W., SHIMMON, R. y GIBSON, L. F. (2006). An inhibitory substance produced by *Aeromonas media* A199, an aquatic probiotic. *Aquaculture, 254*: 115-124

LEVENFORS, J. L., HEDMAN, R., THANING, C., GERHARDSON, B. y WELCH, C. J. (2004). Broad-spectrum antifungal metabolites produced by the soil bacterium *Serratia plymuthica* A 153. *Soil Biol Biochem, 36*: 677-685

LOCATELLI, L., TARNAWSKI, S., HAMELIN, J., ROSSI, P., ARAGNO, M. y FROMIN, N. (2002). Specific PCR Amplification for the Genus *Pseudomonas* Targeting the 3' Half of 16S rDNA and the Whole 16S–23S rDNA Spacer. *System Appl Microbiol, 25*: 220-227

LÓPEZ-DÓRIGA, M. V. (1995). Patología ultrastructural del tegumento de truchas (*Salmo trutta* L.) infectadas por *Saprolegnia*. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo, Oviedo, España

MAEDA, M., NOGAMI, K., KANEMATSU, M. y HIRAYAMA, K. (1997). The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiologia, 358*: 285-290

McKEEGAN, K. S., BORGES-WALMSLEY, M. I. y WALMSLEY, A. R. (2002). Microbial and viral drug resistance mechanisms. *Trends Microbiol, 10*: 8-14

MESHRAM, S. U., JOSHI, S., KAMDI, R. y PESHWE, S. (1998). *In vitro* interaction of microbial biopesticides with fish pathogens prevailing in aquaculture food industry. *J Food Sci Technol, 35*: 177-178

MUZZARELLI, R., A., A., MUZZARELLI, C., TARSI, R., MILIANI, M., GABANELLI, F. y CARTOLARI, M. (2001). Fungistatic activity of modified chitosans against *Saprolegnia parasitica*. *Biomacromol, 2*: 165-169

NAMBA, A., MANO, N. y HIROSE, H. (2006). Phylogenetic análisis of intestinal bacteria and their adhesive capability in relation to the intestinal mucus of carp. *J Appl Microb, 102*: 1307-1317

NEDOLUHA, P. C. y WESTHOFF, D. (1997). Microbiology of striped bass grown in three aquaculture systems. *Food Microbiol, 14*: 255-264

NEDOLUHA, P. C., OWENS, S., RUSSEK-COHEN, E. y WESTHOFF, D. (2001). Effect of sampling method on the representative recovery of microorganisms from the surfaces of aquacultured finfish. *J Food Protect, 64*: 1515-1520

NEISH, G. A. y HUGHES, G. C. (1980). *Fungal Diseases of Fishes*. T. F. H. Publications, Neptune, New Jersey (U.K.)

NEUHAUS, H., VAN DER MAREL, M., CASPARI, N., MEYER, W., ENSS, M. L. y STEINHAGEN, D. (2007). Biochemical and histochemical study on the intestinal mucosa of the common carp *Cyprinus carpio* L., with special consideration of mucin glycoproteins. *J Fish Biol, 70*: 7523-1534

NEWAJ-FYZUL, A., ADESIYUN, A. A., MUTANI, A., RAMSUBHAG, A., BRUNT, J. y AUSTIN, B. (2007). *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J Appl Microbiol, 103*: 1699-1706

NIETO, T. P., TORANZO, A. E. y BARJA, J. L. (1984). Comparison between the bacterial flora associated with fingerling rainbow trout cultured in two different hatcheries in the North-West of Spain. *Aquaculture, 42*: 193-206

NIKOSKELAINEN, S., SALMINEN, S., BYLUND, G. y 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

NILSEN, H., OLSEN, A. B., BOTTOLFSEN, K. y SOLTVEDT, E. (2005). Bacterial skin flora of Atlantic salmon and cod during the winter season in Western Norway. *12th Internacional Conference of the EAFP. Copenhagen, Denmark.11-16 September 2005*, p.10.11

NOGA E. J. y DYKSTRA, M. (1986). *Oomycete* fungi associated with ulcerative mycosis in menhaden, *Brevoortia tyrannus* (Latrobe). *J Fish Dis, 9*: 47-53

NURHAJATI, J., ATIRA, ARYANTHA, I. N. P. y KADEK INDAH, D. G. (2012). The curative action of *Lactobacillus plantarum* FNCC 226 to *Saprolegnia parasitica* A3 on catfish (*Pangasius hypophthalamus* Sauvage). *Int Food Res J, 19*: 1723-1727

OLAYEMI, A. B., ADEDAYO, O. y OJO, O. (1991). Microbial flora of six freshwater fish species from Asa river, Ilorin, Nigeria. *Rev Biol Trop, 39*: 165-167

O´SULLIVAN, D. J. y O´GARA, F. (1992). Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbial Rev, 56*: 662-676

OUWEHAND, A. C., KIRJAVAINEN, P. V., GRÖNLUND, M.-M., ISOLAURI, E. y SALMINEN, S. J. (1999). Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *Int Dairy J, 9*: 623-630

OUWEHAND, D., BÅTSMAN, A. y SALMINEN, S. (2003). Probiotics for the skin: a new area of potential application? *Lett Appl Microbiol, 36*: 327-331

PÉREZ-SÁNCHEZ, T., BALCÁZAR, J. L., GARCÍA, Y., HALAIHEL, N., VENDRELL, D., DE BLAS, I., MERRIFIELD, D. L. y RUIZ-ZARZUELA, I. (2011). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *J Fish Dis, 34*: 499-507

PETERSEN, A., JEGSTRUP, I. y OLSON, L. W. (1994). Screening for bacteria antagonistic to *Saprolegnia parasitica* with BASF pluronic Polyol F-127. En MUELLER, G. J. *Salmon saprolegniasis*, pp. 149-160. U.S. Department of Energy, Bonneville Power Administration, Portland, OR, USA

PHILLIPS, A. J., ANDERSON, ROBERTSON, E. J., SECOMBES, C. J. y van WEST, P. (2008). New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends Microbiol, 16:* 13-19

PICKERING, A. D. (1977). Seasonal changes in the epidermis of the brown trout, *Salmo trutta* (L.). *J Fish Biol, 10*: 561-566

PICKERING, A. D. (1994). Factors influencing the susceptibility of salmonid fish to saprolegniasis. En MUELLER, G.J. *Salmon saprolegniasis*, pp. 67-86. U.S. Department of Energy, Bonneville Power Administration, Portland, OR, USA

PICKERING, A. D. y WILLOUGHBY, L. G. (1982). *Saprolegnia* infections of salmonid fish. En ROBERTS, R.J. *Microbial Diseases of Fish*, pp. 271-297. Academic Press, London

POND, M. J., STONE, D. M. y ALDERMAN, D. J. (2006). Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture, 261*: 194-203

RAN, C., CARRIAS, A., WILLIAMS, M. A., CAPPS, N., DAN, B. C. T., NEWTON, J. C., KLOEPPER, J. W., OOI, E. L., BROWDY, C. L., TERHUNE, J. S. y LILES, M. R. (2012). Identification of *Bacillus* Strains for Biological Control of Catfish Pathogens. PLoS ONE*, 7*: 1-9

RAND, T. G. y MUNDEN, D. (1993). Chemotaxis of zoospores of two fish-egg-pathogenic strains of *Saprolegnia diclina* (*Oomycotina*: Saprolegniaceae) towards salmonid egg chorion extracts and selected amino acids and sugars. *J Aquat Anim Health, 5*: 240-245

RICHARDS, R. H. y PICKERING, A. D. (1979). Changes in serum parameters of *Saprolegnia*-infected brown trout, *Salmo trutta* L. *J Fish Dis, 2*: 197-206

RINKINEN, M., WESTERMARCK, E., SALMINEN, S. y OUWEHAND, A. C. (2003). Absence of host specificity for *in vitro* adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Vet Microbiol, 97*: 55-61

ROBERGE, C., PAEZ, D. J., ROSSIGNOL, O., GUDERLEY, H., DODSON, J., BERNATCHEZ, L. (2007). Genome-wide survey of the gene expression response to saprolegniasis in Atlantic salmon. *Mol Immunol, 44*: 1374-1383

ROMERO, J. y NAVARRETE, P. (2006). 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microbial Ecol, 51*: 422-430

RUSSO, A., MOËNNE-LOCCOZ, Y., FEDI, S., HIGGINS, P., FENTON, A., DOWLING, D. N., O´REGAN, M. y O´GARA, F. (1996). Improved delivery of biocontrol *Pseudomonas* and their antifungal metabolites using alginate polymers. *Appl Microbiol Biotechnol, 44*: 740-745

SALMINEN, S., OUWEHAND, A., BENNO,Y. y LEE, Y. K. (1999). Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci Tech, 10*: 107-110

SCHROERS, V., VAN DER MAREL, M. y STEINHAGEN, D. (2008). Influence of carp intestinal mucus molecular size and glycosylation on bacterial adhesion. *Dis Aquat Org, 81*: 135-142

SEYMOUR, R. L. (1970). The genus *Saprolegnia. Nova Hedwigia, 19*: 1-124

SICA, M. G., BRUGNONI, L. I., MARUCCI, P. L. y CUBITTO, M. A. (2012). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming. *Antonie van Leeuwenhoek, 11*: 869-879

SILVA, F. C. P., BRITO, M. F. G., FARIAS, L. M. y NICOLI, J. R. (2005). Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz. *J Fish Biol, 67*: 1686-1698

SKRODENYTE-ARBACIUSKIENE, V., SRUOGA, A., y BUTKAUSKAS, D. (2006). Assesment of microbial diversity in the river trout *Salmo trutta* fario L. intestinal tract identified by partial 16S rRNA gene sequence analysis. *Fisheries Sci, 72*: 597-602

SMITH, C. J., DANILOWICZ, B. S. y MEIJER, W. G. (2007). Characterization of the bacterial community associated with the surface and mucus layer of whiting (*Merlangius merlangus*). *FEMS Microbiol Ecol, 62*: 90-97

SMITH, S. N., ARMSTRONG, R. A., SPRINGATE, J. y BARKER, G. (1985). Infection and colonization of trout eggs by Saprolegniaceae. *Trans Br Mycol Soc, 85*: 719-723

SMITH, S. N., CHONAN, R., HOWITT, S. G. y ARMSTRONG, R. A. (1994). Proteolytic activity amongst selected *Saprolegnia* species. *Mycol Res, 98*: 389-395

SOLER, L., FIGUERAS, M. J., CHACÓN, M. R., VILA, J., MARCO, F., MARTINEZ-MURCIA, A. J. y GUARRO, J. (2002). Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunol Med Microbiol, 32*: 243-247

SPANGGAARD, B., HUBER, I., NIELSEN, J., NIELSEN, T., APPEL, K. F. y GRAM, L. (2000). The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture, 182*: 1-15

SPANGGAARD, B., HUBER, I., NIELSEN, J., SICK, E. B., PIPPER, C. B., MARTINUSSEN, T., SLIERENDRECHT, W. J. y GRAM, L. (2001). The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environ Microbiol, 3*: 755-765

STUART, M. R. y FULLER, H. T. (1968). Mycological aspects of diseased Atlantic salmon. *Nature*, *217*: 90-92

TAMPIERI, M. P., GALUPPI, R., CARELLE, M. S., MACCHIONI, F., CIONI, P. L. y MORELLI, I. (2003). Effect of selected essential oils and pure compounds on *Saprolegnia parasitica*. *Pharmac Biol, 41*: 584-591

THOEN, E., EVENSEN, O. y SKAAR, I. (2011). Pathogenicity of *Saprolegnia* spp. to Atlantic salmon, *Salmo salar* L., eggs. *J Fish Dis, 34*: 601-608

VAN DER MAREL, M., SCHROERS, V., NEUHAUS, H. y 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*: 321-330

VAN WEST, P. (2006). *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist, 20*: 99-104

VENDRELL, D., BALCÁZAR, J. L., DE BLAS, I., RUIZ-ZARZUELA, I., GIRONÉS, O. y MÚZQUIZ, J. L. (2007). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 31*: 337–345

VERSCHUERE, L., ROMBAUT, G., SORGELOOS, P. y VERSTRAETE, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Molec Biol Rev, 64*: 655-671

VILJAMAA-DIRKS S., PENTIKÄINEN J., HEINIKAINEN, S. y KURONEN H. (2005). Frequent isolation of *Iodobacter* sp. in connection with saprolegniosis. 12th International Conference of the EAFP, 11-16 September, Copenhaguen, Denmark. p. 83 (O-083)

VINE, N. G., LEUKES, W. D. y KAISER, H. (2004[a]). *In vitro* growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiol Letters, 231*: 145-152

VINE, N. G., LEUKES, W. D., KAISER, H., DAYA, S., BAXTER, J. y HECHT, T. (2004[b]). Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J Fish Dis, 27*: 319-326

WADSTROUM, T., ANDERSSON, K., SYDOW, M., AXELSSON, L., LINDGREN, S. y GULLMAR, B.†. (1987). Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J Appl Bacteriol, 62*: 513-520

WANG, Y., LI, J. y LIN, J. (2008). Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture, 281*: 1-4

WILLOUGHBY, L. G. (1978). Saprolegniasis of salmonid fish in Windermere: a critical analysis. *J Fish Dis, 1*: 51-67

WILLOUGHBY, L. G. (1985). Rapid preliminary screening of *Saprolegnia* on fish. *J Fish Dis, 8*: 473-476

WILLOUGHBY, L. G. (1994). *Fungi and fish diseases*. Pisces Press, Stirling

WOOD, S. E. y WILLOUGHBY, L. G. (1986). Ecological observations on the fungal colonization of fish by Saprolegniaceae in Windermere. *J Appl Ecol, 23*: 737-749

WOOD, S. E., WILLOUGHBY, L. G. y BEAKES, G. W. (1988). Experimental studies on uptake and interaction of spores of the *Saprolegnia diclina-parasitica* complex with external mucus of brown trout (*Salmo trutta*). *Trans Br Mycol Soc, 90*: 63-73

YANG, G., BAO, B., PEATMAN, E., LI, H., HUANG, L. y REN, D. (2007). Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish *Takifugu obscurus*. *Aquaculture, 262*: 183-191

ZHANG, S. J., YANG, X. L., LI, D., LI, Y. y GAO, P. (2008). Screening of antagonistic bacterium strain against saprolegniosis and the preliminary study of *in vitro* antagonistic activity. *Acta Hydrobiol Sin, 32*: 301-307