



DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL  
FACULTAD DE VETERINARIA  
UNIVERSIDAD DE LEÓN



BIOCONTROL DE LA  
SAPROLEGNIOSIS POR  
*Saprolegnia parasitica* EN TRUCHA  
ARCOÍRIS *Oncorhynchus mykiss*  
UTILIZANDO BACTERIAS  
AISLADAS DE PECES  
CONTINENTALES Y MARINOS



Tesis Doctoral de  
Concepción González Palacios  
León, Julio de 2017



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL**



Memoria presentada por la Licenciada en Veterinaria  
Dña. Concepción González Palacios 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, Julio de 2017



# Agradecimientos



Mosaico Romano, Museo de Trípoli (cedida por Xavier Sierra autor del blog Un dermatólogo en el museo <http://xsierrav.blogspot.com.es>)



Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que de algún modo han contribuido a este trabajo de tesis doctoral especialmente:

A mis directores de tesis, los Drs. José Miguel Aller Gancedo y Juan Miguel Fregeneda Grandes, por aceptarme como becaria para este trabajo, su apoyo, colaboración y paciencia durante este tiempo.

A la Consejería de la Junta de Castilla y León y al Fondo Social Europeo por dotarme con un contrato predoctoral para la realización de esta tesis.

A los proyectos AGL2010-18562 y AGL2014-54683-R concedidos por Ministerio de Ciencia e Innovación y Ministerio de Economía y Competitividad, respectivamente, por proporcionar la financiación necesaria para el desarrollo de los estudios de esta tesis.

Al Dr. Leandro Rodríguez Aparicio por la aportación de sus conocimientos y al personal del Departamento de Bioquímica de la Universidad de León por su ayuda en la parte de aislamiento de proteínas de la fase experimental, en especial a Eduardo y Jenifer.

Al Departamento de Sanidad Animal por permitirme emplear diferentes equipos necesarios para este trabajo.

Al Servicio Territorial de Medio Ambiente de León (Junta de Castilla y León) por proveernos de trucha común para algunos ensayos de esta tesis.

A la piscifactoría de Castrillo del Condado (León) del grupo Eurotrucha S.L. por proporcionarnos casi todos los peces empleados en los ensayos de esta tesis y gran parte del pienso, y por toda la amabilidad concedida.

A Skretting España por suministrar el pienso empleado en algunos ensayos, y en especial a Julio Docando.

Al Dr. Luis Ignacio Pérez Ordoyo por ayudarme en mis primeros pasos en las técnicas con bacterias.

A la Dra. Maria Camino López Fierro por dedícame su tiempo para enseñarme la técnica de extracción de macrófagos.

A mis compañeros de la Unidad de Enfermedades Infecciosas, y muy especialmente a los que ya considero más que compañeros amigos, Gloria y Rubén; por su ayuda, apoyo, infinita paciencia, y sobre todo por enseñarme tantas cosas nuevas.

A mis padres y mi hermano que siempre han cuidado de mí.



# Índice

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>V</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Saprolegniosis.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2. Probióticos en acuicultura.....</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Material y métodos generales para <i>Saprolegnia parasitica</i>....</b>	<b>27</b>
<b>3.2. Material y métodos bacteriológicos generales.....</b>	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO 4. BIOCONTROL DE LA SAPROLEGNIOSIS CON BACTERIAS CUTÁNEAS DE TRUCHA COMÚN <i>Salmo trutta</i> Y TRUCHA ARCOÍRIS <i>Oncorhynchus mykiss</i>, AISLADAS EN LA PROVINCIA DE LEÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. Biocontrol de la saprolegniosis en trucha arcoíris añadiendo la bacteria potencialmente probiótica al agua.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1.1. Introducción.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1.2. Material y métodos.....</b>	<b>31</b>
4.1.2.1. Bacterias.....	31
4.1.2.2. Preparación de las zoosporas de <i>S. parasitica</i> .....	32
4.1.2.3. Peces y tanques.....	32
4.1.2.4. Infección experimental con <i>S. parasitica</i> .....	33
4.1.2.5. Análisis estadístico.....	34
<b>4.1.3. Resultados.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.4. Discusión.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2. Biocontrol de la saprolegniosis en trucha arcoíris añadiendo la bacteria potencialmente probiótica al pienso.....</b>	<b>37</b>

<b>4.2.1. Introducción.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2.2. Material y métodos.....</b>	<b>38</b>
4.2.2.1. Propiedades de <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89 y LE141 respecto a su utilización en el pienso.....	38
4.2.2.2.1. Resistencia a diferentes pH.....	38
4.2.2.1.2. Resistencia a bilis fresca .....	38
4.2.2.1.3. Crecimiento en moco intestinal y cutáneo.....	39
4.2.2.1.4. Patrón de sensibilidad a antibióticos.....	39
4.2.2.1.5. Supervivencia de la bacteria mezclada con el pienso.....	39
4.2.2.2. Biocontrol de la saprolegniosis en trucha arcoíris añadiendo <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89 o LE141 al pienso.....	40
4.2.2.2.1. Bacterias y preparación del pienso.....	40
4.2.2.2.2. Peces y tanques.....	40
4.2.2.2.3. Administración de la bacteria probiótica y desafío con <i>S. parasitica</i> .....	40
4.2.2.2.4. Análisis estadístico.....	41
<b>4.2.3. Resultados.....</b>	<b>41</b>
4.2.3.1. Propiedades de <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89 y LE141 respecto a su utilización en el pienso.....	41
4.2.3.1.1. Resistencia a diferentes pH.....	41
4.2.3.1.2. Resistencia a bilis fresca .....	42
4.2.3.1.3. Crecimiento en moco intestinal y cutáneo.....	43
4.2.3.1.4. Patrón de sensibilidad a antibióticos.....	43
4.2.3.1.5. Supervivencia en el pienso.....	44
4.2.3.2. Biocontrol de la saprolegniosis en trucha arcoíris añadiendo <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89 o LE141 al pienso.....	45
<b>4.2.4. Discusión.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3. Estimulación de la respuesta inmunitaria y otros mecanismos de acción de <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89 y LE141.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3.1. Introducción.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3.2. Material y métodos.....</b>	<b>48</b>

4.3.2.1. Estimulación de la respuesta inmunitaria innata en trucha arcoíris añadiendo LE89 o LE141 al agua.....	48
4.3.2.2. Producción de siderófos.....	51
4.3.2.3. Sustancias inhibidoras de <i>S. parasitica</i> presentes en las células y sobrenadantes de LE89 y LE141.....	52
<b>4.3.3. Resultados.....</b>	<b>54</b>
4.3.3.1. Estimulación de la respuesta inmunitaria innata en trucha arcoíris añadiendo los aislados LE89 o LE141 al agua.....	54
4.3.3.2. Producción de siderófos.....	57
4.3.3.3. Sustancias inhibidoras de <i>S. parasitica</i> presentes en las células y sobrenadantes de LE89 y LE141.....	57
<b>4.3.4. Discusión.....</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO 5. BIOCONTROL DE LA SAPROLEGNIOSIS CON BACTERIAS PROBIÓTICAS, QUE SON EFICACES EN EL CONTROL DE VIBRIOSIS EN LUBINA <i>Dicentrarchus labrax</i> Y LACTOCOCOSIS EN TRUCHA ARCOÍRIS <i>Oncorhynchus mykiss</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>5.1. Inhibición del crecimiento in vitro de <i>Saprolegnia parasitica</i> por <i>Enterococcus gallinarum</i> L1, <i>Vagococcus fluvialis</i> L21 y <i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3.....</b>	<b>65</b>
<b>5.1.1. Introducción.....</b>	<b>65</b>
<b>5.1.2. Material y métodos.....</b>	<b>65</b>
5.1.2.1. Bacterias y <i>S. parasitica</i> .....	65
5.1.2.2. Inhibición del crecimiento del micelio de <i>S. parasitica</i> en medio sólido.....	65
5.1.2.3. Inhibición del crecimiento de <i>S. parasitica</i> en cañamón.....	66
5.1.2.4. Inhibición de la germinación de los quistes de <i>S. parasitica</i> .....	66
5.1.2.5. Acción fungicida de las bacterias.....	66
5.1.2.6. Inhibición del crecimiento miceliar y de la germinación de los quistes de <i>S. parasitica</i> utilizando los sobrenadantes bacterianos.....	67
<b>5.1.3. Resultados.....</b>	<b>67</b>
5.1.3.1. Inhibición del crecimiento de <i>S. parasitica</i> en medio sólido.....	67
5.1.3.2. Inhibición del crecimiento de <i>S. parasitica</i> en cañamón.....	68
5.1.3.3. Inhibición de la germinación de los quistes de <i>S. parasitica</i> .....	69

5.1.3.4. Acción fungicida de las bacterias.....	70
5.1.3.5. Inhibición del crecimiento micelial y de la germinación de los quistes de <i>S. parasitica</i> utilizando los sobrenadantes bacterianos.....	72
<b>5.1.4. Discusión.....</b>	<b>73</b>
<b>5.2. Adhesión de <i>Enterococcus gallinarum</i> L1, <i>Vagococcus fluvialis</i> L21 y <i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 al moco cutáneo de trucha común e inhibición de la adhesión de los quistes de <i>Saprolegnia parasitica</i>.....</b>	<b>75</b>
<b>5.2.1. Introducción.....</b>	<b>75</b>
<b>5.2.2. Material y métodos.....</b>	<b>75</b>
5.2.2.1. Bacterias y quistes de <i>S. parasitica</i> .....	75
5.2.2.2. Obtención del moco cutáneo y tapizado de las placas.....	76
5.2.2.3. Adhesión de las bacterias al moco cutáneo.....	76
5.2.2.4. Exclusión de <i>S. parasitica</i> .....	77
5.2.2.5. Desplazamiento de <i>S. parasitica</i> .....	77
5.2.2.6. Competición con <i>S. parasitica</i> .....	77
5.2.2.7. Análisis estadístico.....	77
<b>5.2.3. Resultados.....</b>	<b>77</b>
<b>5.2.4. Discusión.....</b>	<b>79</b>
<b>5.3. Comprobación de la ausencia de patogenicidad de <i>Enterococcus gallinarum</i> L1 y <i>Vagococcus fluvialis</i> L21 para la trucha arcoíris <i>Oncorhynchus mykiss</i>.....</b>	<b>80</b>
<b>5.3.1. Introducción.....</b>	<b>80</b>
<b>5.3.2. Material y métodos.....</b>	<b>80</b>
5.3.2.1. Peces y tanques.....	80
5.3.2.2. Bacterias e inoculación.....	80
<b>5.3.3. Resultados.....</b>	<b>81</b>
<b>5.3.4. Discusión.....</b>	<b>81</b>
<b>5.4. Biocontrol de la saprolegniosis en trucha arcoíris añadiendo <i>Enterococcus gallinarum</i> L1, <i>Vagococcus fluvialis</i> L21 y <i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 al agua o al pienso.....</b>	<b>82</b>
<b>5.4.1. Introducción.....</b>	<b>82</b>

<b>5.4.2. Material y métodos.....</b>	<b>82</b>
5.4.2.1. Bacterias.....	82
5.4.2.2. Desafío experimental añadiendo el probiótico en el agua.....	82
5.4.2.3. Desafío experimental añadiendo el probiótico en el pienso.....	83
5.4.2.4. Análisis estadístico.....	83
<b>5.4.3. Resultados.....</b>	<b>83</b>
<b>5.4.4. Discusión.....</b>	<b>83</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>89</b>
Anexo I: Abreviaturas y símbolos.....	91
Anexo II: Relación de cuadros.....	95
Anexo III: Relación de figuras.....	99
Anexo IV: Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales y publicaciones previstas en revistas JCR.....	103
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>105</b>



# Resumen



Representación de un pez oxirrinco (*Mormyrus* sp.) simbolizando a la diosa egipcia Tueris en la pared de una tumba del siglo VI a.C. encontrada en el Yacimiento Arqueológico de Oxirrinco (El-Bahnasa) Egipto. (<http://www.ub.edu/museuvirtual>)



La saprolegniosis es una enfermedad que afecta a peces de agua dulce, ocasionando importantes pérdidas económicas en el cultivo de la trucha arcoíris y otros salmónidos. Los tratamientos preventivos y curativos empleados actualmente no cubren todas las necesidades durante el cultivo y presentan una serie de inconvenientes en lo relativo a su efectividad y la seguridad en su empleo.

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se obtuvieron varias bacterias con capacidad inhibitoria *in vitro* frente a *Saprolegnia parasitica*, el principal agente etiológico de la saprolegniosis, por lo que se planteó la realización de este trabajo de tesis doctoral con la finalidad de aplicar estas bacterias en el biocontrol de la saprolegniosis en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), así como investigar el modo de acción de aquellas bacterias que resultasen eficaces en el control de la enfermedad. Posteriormente también se utilizaron tres bacterias, cedidas por otros autores, que habían demostrado su capacidad probiótica frente a otras enfermedades de peces.

En la primera parte del trabajo se utilizaron 15 bacterias aisladas de piel de trucha que en estudios previos de nuestro grupo inhibieron a *S. parasitica in vitro*. Se comprobó la acción preventiva de cada una de las bacterias frente a la infección experimental con *S. parasitica* en trucha arcoíris añadiendo la bacteria en el agua del tanque. Con las bacterias que controlaron la saprolegniosis a través del agua también se probó su acción preventiva por vía oral añadiéndolas al pienso de los peces.

Dos de los 15 aislados bacterianos, *Pseudomonas fluorescens* LE89 y LE141, protegieron a la trucha arcoíris frente a la saprolegniosis cuando se añadieron al agua del tanque, proporcionando un porcentaje de peces no infectados del 75,51 % y 57,18 % respectivamente. Por el contrario estas bacterias no protegieron cuando se administraron con el pienso.

Con LE89 y LE141 se investigó su mecanismo de acción, efectuando ensayos de producción de sideróforos, estimulación de la respuesta inmunitaria en trucha arcoíris y la producción de sustancias con capacidad inhibitoria. Ambas bacterias produjeron sideróforos. Respecto a la respuesta inmunitaria los peces tratados con LE141 tuvieron un incremento significativo de la actividad fagocitaria de los macrófagos del pronefros, un ascenso en el número de los monocitos y un aumento de la concentración de las proteínas del suero. En cuanto a las sustancias responsables de la inhibición de *S. parasitica*, en los sobrenadantes de LE89 y LE141 se encontraron sustancias de naturaleza proteica. En el caso de LE89 estas se correspondieron con sideróforos y en LE141 se comprobó la presencia de un péptido de unos 66 kDa, que deberá estudiarse con más profundidad.

En la segunda parte de este trabajo se estudió la inhibición *in vitro* de *S. parasitica* por las bacterias probióticas *Vagococcus fluvialis* L21 y *Enterococcus gallinarum* L1 eficaces frente a la vibriosis en lubina y *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* CLFP3 eficaz frente a la lactococosis en trucha arcoíris.

Las tres bacterias inhibieron *in vitro* el crecimiento de *S. parasitica* en medio de cultivo sólido. *E. gallinarum* y *V. fluvialis* presentaron una inhibición alta del crecimiento del micelio en medio líquido, mientras que en este caso la inhibición de *L. plantarum* fue nula. Las tres inhibieron la germinación de los quistes en medio líquido, pero *L. plantarum* precisó de concentraciones bacterianas más elevadas que las otras dos cepas. Todas mostraron acción fungicida, pero *L. plantarum* precisó de una incubación de 48 horas mientras que en el caso de *V. fluvialis* y *E. gallinarum* necesitaron solo 24 horas de incubación.

En los ensayos *in vitro* de competición, exclusión y desplazamiento con quistes de *S. parasitica* usando como sustrato moco cutáneo de trucha común (*Salmo trutta*), las tres bacterias redujeron la adhesión de los quistes al moco en condiciones de competición y exclusión, pero los porcentajes en condiciones de desplazamiento fueron menores incluso con las concentraciones bacterianas más elevadas.

En las pruebas *in vivo* con trucha arcoíris infectada experimentalmente con *S. parasitica*, ninguna de las tres bacterias protegió frente a la infección cuando se añadió al agua del tanque o al pienso, a pesar de los aceptables resultados *in vitro*.

# Summary



Mosaico Romano, Museo de El-Jem (cedida por Xavier Sierra autor del blog Un dermatólogo en el museo <http://xsierrav.blogspot.com.es>)



Saprolegniosis is a disease that affects freshwater fish, causing significant economic losses in farmed rainbow trout and other salmonids. The preventive and curative treatments currently used in aquaculture do not cover all the needs and present a series of disadvantages as regards its effectiveness and the safety in its use.

In previous work of our research group, several bacteria with *in vitro* inhibitory capacity against *Saprolegnia parasitica* were obtained, which it is the main aetiological agent of saprolegniosis. Therefore, it was proposed to carry out this thesis in order to apply these bacteria in the biocontrol of saprolegniosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), as well as investigate the mode of action of those bacteria that are effective in the control of the disease. Subsequently, three bacteria provided by other authors were also used, who had demonstrated their probiotic capacity against other fish diseases.

In the first part of the work, 15 bacteria isolated of trout skin were used, which in previous studies of our group inhibited *S. parasitica in vitro*. The preventive action of each one of the bacteria was verified against the experimental infection with *S. parasitica* in rainbow trout adding the bacteria in the water of the tank. With the bacteria that controlled the saprolegniosis through the water its preventive action by oral route was also proved, adding them to the feed of the fish.

Two of the 15 bacterial isolates, *Pseudomonas fluorescens* LE89 and LE141, protected rainbow trout from saprolegniosis when added to tank water, providing a no infected fish percentage of 75.51% and 57.18%, respectively. On the contrary these bacteria did not protect when they were administered with the feed.

With LE89 and LE141 their mechanism of action was investigated, carrying out siderophore production tests, stimulation of the immune response in rainbow trout and production of substances with inhibitory activity. Both bacteria produced siderophores. Regarding the immune response, the fish treated with LE141 had a significant increase in the phagocytic activity of the head-kidney macrophages, a rise of the monocyte number, and an increase of the concentration of serum proteins. As for the substances responsible for the inhibition of *S. parasitica*, substances of a protein nature were found in the supernatants of LE89 and LE141. In the case of LE89 these corresponded to siderophores and in LE141 the presence of a peptide of about 66 kDa was found, which should be studied in more details.

In the second part of this work, the *in vitro* inhibition of *S. parasitica* by the probiotic bacteria *Vagococcus fluvialis* L21 and *Enterococcus gallinarum* L1 effective against vibriosis in sea bass and *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* CLFP3 effective against lactococcosis in rainbow trout.

All three bacteria inhibited *in vitro* the growth of *S. parasitica* in solid culture medium. *E. gallinarum* and *V. fluvialis* showed a high inhibition of mycelial growth in liquid medium, whereas in this case the inhibition of *L. plantarum* was null. All three inhibited

the germination of the cysts in liquid medium, but *L. plantarum* required higher bacterial concentrations than the other two strains. All showed fungicidal action, but *L. plantarum* required 48 hour incubation whereas in the case of *V. fluvialis* and *E. gallinarum* they required only 24 hours of incubation.

In the *in vitro* competition, exclusion and displacement tests with *S. parasitica* cysts using brown trout (*Salmo trutta*) cutaneous mucus as substrate, all three bacteria reduced the adhesion of cysts to mucus under competition and exclusion conditions, but the percentages under displacement conditions were lower even with the highest bacterial concentrations.

In the *in vivo* tests with rainbow trout experimentally infected with *S. parasitica*, none of the three bacteria protected against infection when added to tank water or feed, despite the acceptable *in vitro* results.

# CAPÍTULO 1

## Revisión bibliográfica



Representación del horóscopo Piscis en el friso de la puerta del cordero de la basílica de San Isidoro de León siglos XI y XII



## 1.1. SAPROLEGNIOSIS

La saprolegniosis es una enfermedad propia de peces de agua dulce que puede aparecer en cualquiera de las fases de su ciclo biológico. Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de lesiones cutáneas de color blanquecino y aspecto algodonoso debido al crecimiento del micelio del agente patógeno sobre la piel. Las lesiones afectan al tegumento del pez y las branquias evolucionando tanto en extensión por la superficie del pez, como en profundidad afectando al tejido muscular subyacente.

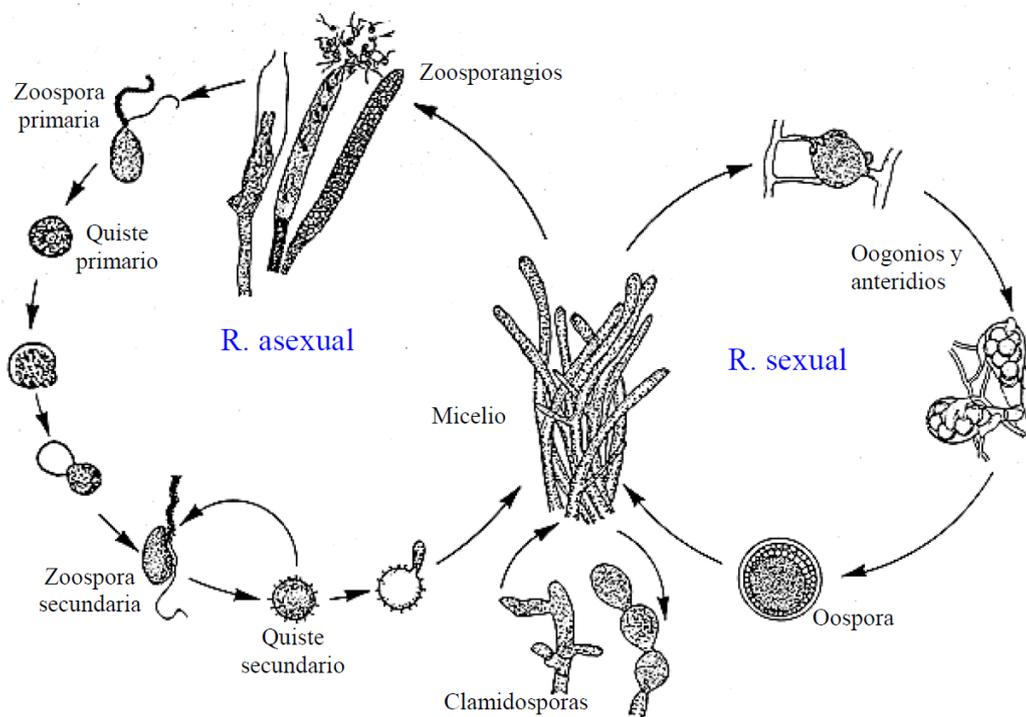
El agente etiológico de la enfermedad pertenece al género *Saprolegnia* que taxonómicamente se encuadra dentro del reino *Chromista*, filo *Oomycota*, clase *Oomycetes*, orden *Saprolegniales* y familia *Saprolegniaceae* (Kirk y col., 2008). Dentro de las diversas especies del género *Saprolegnia* solo unas pocas han sido descritas como patógenas, destacando entre todas ellas *Saprolegnia parasitica*.

*Saprolegnia parasitica* ha recibido diversas denominaciones y muchos de los aislados obtenidos de peces enfermos, sobre todo en los salmónidos, frecuentemente no producen estructuras sexuales cuando son cultivados en el laboratorio dificultando su identificación mediante los métodos clásicos. Sin embargo, las técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa han ayudado a clarificar la taxonomía del género (Molina y col., 1995; Hulvey y col., 2007; Sandoval-Sierra y col., 2014). Existen estudios que sugieren que los aislados patógenos de *Saprolegnia* constituyen un taxón separado del resto de especies consideradas saprófitas y recomiendan que se utilice el nombre de *Saprolegnia parasitica* sustituyendo a denominaciones anteriores como *Saprolegnia* sp., *Saprolegnia diclina* tipo 1 y otras (Diéguez-Uribeondo y col., 2007).

*Saprolegnia* spp. presenta un ciclo biológico complejo con dos formas de reproducción, una sexual y otra asexual (Figura 1). En la reproducción sexual se producen gametangios masculinos conocidos como anteridios y gametangios femeninos denominados oogonios. La penetración del contenido de la célula anteridial en el oogonio da lugar a las oosporas que germinarán formando un nuevo micelio. De forma clásica la morfología de estas estructuras sexuales ha sido empleada para identificar las diferentes especies del género *Saprolegnia*.

Dentro de la reproducción asexual en el extremo de las hifas cenocíticas se genera un tabique basal que separa una estructura apical denominada zoosporangio, en cuyo interior se forman las zoosporas primarias que son liberadas y nadan durante un breve espacio de tiempo antes de enquistarse y generar los quistes primarios que pueden germinar directamente dando lugar a un nuevo micelio, pero que generalmente originan zoosporas secundarias. Estas zoosporas secundarias nadan más tiempo que las primarias antes de dar origen a los quistes secundarios, que pueden germinar formando nuevas hifas o pueden generar nuevas zoosporas en un fenómeno conocido como poliplanetismo que favorece la dispersión. La zoospora secundaria o el quiste

secundario se considera la forma infectante de las cepas patógenas de *S. parasitica* (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo biológico de *Saprolegnia* spp. (Adaptado de Hughes, 1980).

La infección por *S. parasitica* en los peces tiene lugar por vía cutánea, aunque también se ha descrito el contagio por vía digestiva en salmónidos juveniles (Neish y Huhges, 1980).

En los huevos las zoosporas secundarias de *Saprolegnia* spp. colonizan inicialmente los huevos muertos y desde estos la infección se difunde radialmente hacia los huevos vivos (Smith y col., 1985).

La saprolegniosis se encuentra distribuida por todo el mundo y afecta a numerosas especies de peces de agua dulce en cualquier fase de su ciclo biológico, desde los huevos hasta los reproductores (Bruno y col., 2011), en nuestro entorno afecta fundamentalmente a la trucha común de río (*Salmo trutta*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en piscifactorías, aunque también se ha descrito en otras especies como en *Pseudochondrostoma duriense* (Aller-Gancedo y col., 2016). En ecosistemas marinos no aparece debido a que la salinidad afecta a la supervivencia de *Saprolegnia* spp. aunque se describen casos de enfermedad en estuarios (Noga y Dykstra, 1986).

En España la aparición de brotes agudos de saprolegniosis en la década de los ochenta del s. XX en los ríos de la provincia de León (Aller Gancedo y Fernández Díez, 1987)

provocó un descenso en las poblaciones naturales de *Salmo trutta* causando un gran impacto ecológico.

En las piscifactorías, la saprolegniosis puede presentarse de forma endémica con bajas continuas de peces y supone un grave problema en los huevos en incubación, además la enfermedad ha resurgido desde la prohibición del uso del verde malaquita por lo que se considera que tiene un elevado impacto económico en la acuicultura continental (Bruno y col., 2011; Van Den Berg y col., 2013).

Las especies de la familia *Saprolegniaceae* se consideran ubicuas en los ecosistemas de agua dulce (Neish y Hughes, 1980) lo que implicaría que los peces se encuentran en contacto continuo con zoosporas de *Saprolegnia* spp. potencialmente patógenas sin que en la mayoría de los casos lleguen a enfermar, por lo que se considera que existen una serie de factores predisponentes muy importantes asociados a un aumento de la receptividad a la saprolegniosis (Pickering, 1994).

Dentro de los factores predisponentes uno de los principales es la ausencia de integridad en el tegumento y un descenso en la producción del moco cutáneo, que actúan como mecanismo inmunitario inespecífico evitando la entrada de infecciones por *Saprolegnia* spp. En este sentido los traumatismos en la epidermis del pez suelen ser necesarios para reproducir la infección por *S. parasitica* en condiciones experimentales (Neish y Hughes, 1980; Hatai y Hoshiai, 1994; Fregeneda-Grandes y col., 2001).

En las poblaciones naturales de *Salmo trutta*, es frecuente observar en los peces reproductores lesiones características de saprolegniosis en la zona de la aleta caudal y anal en el caso de las hembras, y en la aleta dorsal en los machos. Estas localizaciones de las lesiones están relacionadas con pequeños traumatismos producidos durante el desove (Richards y Pickering, 1978).

Diversos autores han relacionado la maduración sexual de los peces con una mayor predisposición a la infección por *Saprolegnia* spp. debido a los cambios que se producen en la estructura de la epidermis y el descenso de las células productoras de moco cutáneo (Pickering y Richards, 1980). Dentro de la maduración sexual también se consideraría el aumento de los andrógenos como factor predisponente (Cross y Willoughby, 1989).

Entre las causas que favorecen la infección por *Saprolegnia* spp. en los peces está la presencia de infecciones bacterianas (Hoshina y Ookuba, 1956) o parasitosis (Johnsen, 1978) previas que producen daños en el tegumento del hospedador.

Otro factor predisponente a tener en cuenta es el estrés ambiental al que se hallan sometidos los hospedadores. Una pobre calidad de agua asociada a un incremento de la materia orgánica favorece la aparición de la saprolegniosis (Toor y col., 1983). Elevadas densidades de peces en los estanques y agresión social en los mismos incrementan la aparición de lesiones en el tegumento (Cross y Willoughby, 1989; Richards y Pickering,

1978). El conjunto de los factores estresantes provoca en los peces un aumento de los niveles circulantes de corticoesteroides que aumenta la receptividad a la infección (Neish y Hughes, 1980).

En las piscifactorías la saprolegniosis puede difundirse de diversas formas, según Singhal y col. (1987), la fuente de infección puede estar en peces infectados ya sean silvestres o criados en piscifactorías, huevos infectados, el suministro de agua, vehículos de transporte de peces y alimento, personal o el equipamiento de manejo de los peces. La infección suele producirse generalmente por vía cutánea.

Durante la infección las hifas de *S. parasitica* penetran en el tejido cutáneo, avanzan en extensión por la superficie del pez y alcanzan el musculo subcutáneo pudiendo acceder a los vasos sanguíneos y formar trombos en los mismos (Bruno y col., 2011).

La penetración del micelio a través del tejido cutáneo del pez provoca una ruptura en los tejidos que a medida que avanza la infección por la superficie del pez ocasiona hemodilución disminuyendo los niveles de proteínas séricas y alteraciones en el balance osmótico. En los estadios finales el fallo en la osmorregulación, el fallo respiratorio (si la infección se localiza en las branquias) y en raras ocasiones el fallo multiorgánico ocasiona la muerte del pez (Hatai y Hoshiai, 1994).

Los estudios del genoma de *S. parasitica* involucran a una serie de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogenia de la infección, estas proteínas se consideran factores de virulencia que actúan como promotores de la infección (Jiang y col., 2013). En la etapa pre-infección se secretarían una serie de proteínas que facilitarían la interacción con el hospedador, dentro de estas estarían las lectinas que permitirían la unión de los quistes secundarios a la piel del hospedador. Para el acoplamiento el patógeno involucra una gran cantidad de proteasas que atacan los tejidos del hospedador, siendo *S. parasitica* uno de los organismos con mayor cantidad de proteasas codificadas en su genoma comparada con la mayoría de agentes patógenos fúngicos eucariotas filamentosos. Una de estas proteasas, conocida como SPRG-1457 tiene capacidad para degradar las IgM de *Oncorhynchus mykiss*, lo que indica que el patógeno presenta un rol activo en la supresión de la inmunidad (Jiang y col., 2013) y que además sería necesario para el acceso del patógeno al tegumento ya que se ha demostrado la presencia de inmunoglobulinas IgM en el moco cutáneo de *Salmo salar* en pequeñas cantidades (Hatten y col., 2001).

En los estudios sobre la respuesta inmunitaria a la infección por *S. parasitica* destaca la importancia del sistema inmunitario inespecífico, en el que el tegumento actúa a modo de barrera física impidiendo la entrada del agente patógeno, igualmente el moco cutáneo también establece una barrera entre los peces y el ambiente, actuando como barrera física, química y biológica (Pickering y Willoughby, 1982; Cross y Willoughby, 1989).

Este moco efectuaría una labor de arrastre que impediría la fijación de los quistes secundarios (Willoughby y Pickerig, 1977; Pickering y Willoughby, 1982; Wood y col., 1988).

El moco cutáneo de los peces presenta una composición compleja, con numerosos factores antimicrobianos secretados por las células cutáneas, como aglutininas, inmunoglobulinas, lectinas, lisinas, lisozima; pero estos no parecen tener un papel relevante a la hora de evitar la infección producida por *S. parasitica* (Pickering, 1994).

La ausencia de infiltración leucocitaria en tejidos infectados por *S. parasitica* se relaciona con la inactividad del sistema del complemento (Bly y col., 1992). Fregeneda-Grandes y col. (2009) demostraron una baja prevalencia de anticuerpos en trucha común infectada, lo que sugiere que *S. parasitica* ocasiona una inmunosupresión o la ausencia de una respuesta inmunitaria específica frente a la infección. Sin embargo hay estudios que indican que la respuesta inmunitaria mediada mediante células es eficaz frente a la infección, como en el caso del pez gato (*Ictalurus punctatus*) que a 22 °C cuando se le inoculan intramuscularmente hifas viables de *Saprolegnia* sp., estas son destruidas rápidamente por células multinucleadas gigantes (Bly y col., 1994).

La saprolegniosis se manifiesta como una enfermedad que cursa con lesiones de aspecto algodonoso en la superficie del pez, que afecta al tegumento o las branquias (Neish y Huhges, 1980) y que puede extenderse hasta cubrir prácticamente la superficie corporal. La infección puede progresar destruyendo la epidermis, ocasionando letargo, pérdida de equilibrio, agotamiento y ausencia del reflejo de huida. La enfermedad puede progresar rápidamente provocando la muerte del pez en unas 48 horas (Aller, 1988).

La aparición de las lesiones en el tegumento no son aleatorias, la localización inicial se suele corresponder con áreas cutáneas con lesiones previas. Generalmente las lesiones en la trucha pueden aparecer en cualquier zona de la superficie del pez, generalmente el tegumento, pero las aletas, los ojos y las fosas olfatorias también pueden infectarse (Neish y Hughes, 1980). También se ha descrito la presencia de lesiones en el epitelio intestinal de alevines de trucha arcoíris (Davis y Lazar, 1941). Algunas cepas patógenas de *Saprolegnia* también pueden penetrar en órganos internos en peces de pequeño tamaño (Hatai y Egusa, 1977; Bootsma, 1973).

La infección por *Saprolegnia* spp. causa cambios degenerativos en la epidermis y dermis, con necrosis celular y edema. Se observa la penetración de la hifas que causan la destrucción de la epidermis y la membrana basal, que en los casos más graves progresan hasta la hipodermis y la musculatura (Neish, 1976). En fibras musculares esqueléticas próximas a la dermis aparece vacuolización citoplasmática, degeneración hialina y necrosis (Aller-Gancedo y col., 2016). En peces pequeños las hifas pueden penetrar en tejidos más profundos, afectando al sistema nervioso y vascular, en este último es frecuente observar la presencia de trombos en los vasos sanguíneos (Bootsma, 1973).

En trucha común se observan cambios en los órganos hematopoyéticos, como linfopenia, degeneración de células linfoides, depleción celular, alteraciones en los vasos sanguíneos del órgano, edema, pinocitosis de timocitos, aunque las hifas no invadan directamente los órganos hematopoyéticos. Las alteraciones de estos órganos se asocian a la ausencia de respuesta inflamatoria en las zonas donde penetran las hifas de *Saprolegnia* sp. (Álvarez y col., 1988). Se piensa que la alteración de los órganos linfoides de los peces enfermos se deben a que *Saprolegnia* sp. segregaría una serie de sustancias que actuarían de forma directa sobre los órganos o a un aumento de la producción de corticoesteroides provocada por la producción de proteínas de “choque térmico” (Bly y col., 1992; Álvarez y col., 1995).

Para establecer el diagnóstico de saprolegniosis por *S. parasitica* se debe confirmar que se trata de esta especie y no de otro oomiceto, por ello Aller (1988) indica que el diagnóstico debe ser laboratorial comprobando que el agente aislado no sea un saprófito que haya colonizado el cuerpo del pez *post mortem*.

El diagnóstico laboratorial inicial puede efectuarse mediante una observación microscópica directa de un fragmento del micelio en fresco con agua destilada o teñido con lactofenol azul de algodón, para observar la morfología de las hifas y los zoosporangios. Para poder identificar el agente patógeno una muestra del micelio recogida de la lesión debe lavarse varias veces con agua destilada estéril para eliminar los contaminantes, depositando dicha muestra en una placa de Petri con agua de río estéril y cultivando durante 48 horas a 10 °C para observar los zoosporangios y la forma de liberación de las zoosporas (Tiffney, 1939b; Willoughby, 1985). En el fondo de la placa de Petri podrá observarse mediante microscopia con contraste de fases la germinación indirecta y los filamentos de los quistes secundarios característicos de las cepas de *S. parasitica*.

También puede cultivarse y aislarse *Saprolegnia* spp. a partir de porciones de micelio lavadas con agua destilada estéril sembrándolas en medios sólidos como agar harina de maíz o agar glucosa-peptona, y en agua de río filtrada esteril con cañamones (*Cannabis sativa*), en este último caso para estudiar las estructuras reproductoras sexuales (Willoughby, 1978).

De todos los antifúngicos empleados frente a la saprolegniosis, el verde malaquita fue el más exitoso y efectivo destruyendo zoosporas e inhibiendo el crecimiento de las hifas, pero varios estudios demostraron su toxicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad y la presencia de residuos peligrosos en tejidos (Bills y col., 1977; Clemmesen y col., 1984; Meyer y Jorgenson, 1983; Fernandes y col., 1991).

El uso de verde malaquita fue prohibido en numerosos países, incluidos los pertenecientes a la Unión Europea a partir del año 2000. Desde su prohibición se han empleado productos químicos como la formalina, el peróxido de oxígeno, sulfato de cobre, iodóforos, bronopol, chitosan y otros.

Muchos productos empleados frente a la saprolegniosis presentan una serie de inconvenientes medioambientales al emplearse grandes cantidades de estas sustancias para la prevención y el tratamiento que precisa la industria acuícola, por lo que su empleo tiene un gran impacto en los ecosistemas acuáticos (Willoughby y Roberts, 1992; Schereier y col., 1996), al que se le unen en algunos casos los riesgos en la salud del consumidor si persisten residuos en los tejidos del pez (Kitancharoen y col., 1997). Además ninguno de estos compuestos químicos resulta plenamente satisfactorio, ya que no proporcionan suficiente protección tras el periodo de cría (Forneris y col., 2003).

La formalina es perjudicial por su permanencia en el medio ambiente, su posible efecto carcinogénico en mamíferos y la irritación en vías respiratorias ocasionada por sus vapores (Khomvilai y col., 2005; Van West, 2006); el cloruro sódico a pesar de ser seguro ocasiona estrés osmótico en los peces afectando a aquellos con lesiones en el tegumento, además su uso en ambientes de agua dulce es poco práctico (Andrew y col., 2014); el peróxido de hidrógeno es corrosivo e inflamable sin diluir (Khomvilai y col., 2005); y el bronopol a pesar de ser eficaz es poco económico. Dentro de las alternativas para la prevención y tratamiento de la saprolegniosis se encuentra el asociar unas buenas prácticas de manejo (control de las densidades en los tanques, retirada de animales y huevos infectados, evitar traumatismos de los animales en el manejo, empleo de radiación ultravioleta en el agua de entrada a la piscifactoría, desinfección periódica de las instalaciones...), con el posible uso de extractos de plantas (Chukanhom y col., 2005; Udomkusonsri y col., 2007; Hashemi y col., 2012; Khosravi y col., 2012; Madrid y col., 2015), probióticos (Lategan y col., 2004a, 2004b) o el desarrollo de vacunas.

## 1.2. PROBIÓTICOS EN ACUICULTURA

El concepto de probiótico en acuicultura difiere de la interpretación de probiótico en animales terrestres debido a la particularidad del ambiente acuático en el que el pez desarrolla su ciclo vital. En acuicultura un probiótico es cualquier microorganismo vivo que tiene un efecto beneficioso en el hospedador, al modificar la microbiota del pez (epitelio cutáneo, branquias o tracto gastrointestinal) o la comunidad microbiana del medio en el que se encuentra (Verschuere y col., 2000; Gatesoupe, 1999).

En 2002b, Irianto y Austin propusieron que no sólo se incluyeran como probióticos los microorganismos vivos, si no todos los componentes del microorganismo que benefician la salud del hospedador al mejorar, por ejemplo, la respuesta inmunitaria frente a la enfermedad, lo que posteriormente corroboraron otros autores (Arijo y col., 2008; Sharifuzzaman y col., 2011; Abbass y col., 2010).

Los efectos positivos de los probióticos en el pez se basan en un mejor aprovechamiento de la dieta, una mejora de la respuesta frente a enfermedades o una mejora de la calidad del agua que rodea al animal (Verschuere y col., 2000).

Los probióticos empleados en acuicultura pueden administrarse de diversas formas: a través de la dieta, ya sea mediante la adición de organismos vivos (Gatesoupe, 1991) o inactivados (Salinas y col., 2006, Díaz-Rosales y col., 2006); mediante el baño en una suspensión bacteriana (Smith y Davey., 1993; Gram y col., 1999); la adición de los microorganismos al agua del tanque (Lategan y col., 2004a, 2004b); o a través de la inoculación de compuestos microbianos subcelulares en los peces (Sharifuzzaman y col., 2010).

Se han descrito diversos modos de acción de los probióticos:

- a) Competición por los sitios de unión en la mucosa intestinal y superficie cutánea que impiden la fijación de los microorganismos patógenos (Merrifield y col., 2010; Chabrillon y col., 2005; Sorroza y col., 2012).
- b) Competencia por los nutrientes y fuentes de energía, entre los que destaca la producción de sideróforos de algunas bacterias probióticas para la captación de hierro (Smith y Davey, 1993; Gram y col., 1999).
- c) Producción de sustancias extracelulares con capacidad de inhibición frente a microorganismos patógenos: sustancias antimicrobianas, bacteriocinas, ácidos orgánicos (Lategan y col., 2006).
- d) Contribución a la digestión del alimento mediante la producción de enzimas, vitaminas y ácidos grasos (Ringø y col., 1995).
- e) Estimulación de la respuesta inmunitaria inespecífica: aumento en el recuento de leucocitos (Brunt y Austin, 2005) y eritrocitos (Irianto y col., 2003); incremento de la actividad fagocitaria de los macrófagos del pronefros; estimulación de la explosión respiratoria de los macrófagos (Pierters y col., 2008); favoreciendo la vía alternativa del complemento (Panigrahi y col., 2005); aumentando la actividad de la lisozima presente en el suero y el moco cutáneo (Kim y Austin, 2006); e incrementando la presencia de IgM en el suero (Song y col., 2006).

Dentro de las características deseables en un probiótico, en general es preferible que aquellos que se emplean en acuicultura sean aislados de la especie o el medio acuático en el cual se van a aplicar tal como se explica seguidamente.

La microbiota presente en los animales acuáticos está constituida por la microbiota indígena y elevados niveles de microorganismos alóctonos presentes en el agua circundante (Hansen y Olafsen, 1989).

El éxito del empleo de cepas probióticas se verá favorecido si estas actúan como buenas competidoras frente a los microorganismos de la microbiota residente del pez, lo que permitiría que su población persista una vez cese la administración del probiótico (Nayak, 2010). Además se cree que si se emplean cepas aisladas del pez hospedador, las

células inmunitarias no reaccionarían frente a una bacteria autóctona presente de forma natural en el pez (Díaz-Rosales y col., 2006).

En general se asume que el empleo de una especie bacteriana que no forma parte de la flora indígena del pez precisa del uso de elevadas dosis para dar lugar a una dominancia de esta especie de forma temporal y, además, transcurrido un tiempo tras el cese de la administración del probiótico el número de bacterias disminuye o desaparece (Fuller, 1992).

La estabilidad del probiótico dependerá en gran medida de su resistencia al pH gástrico, sales biliares y proteasas si es administrado por vía oral (Vine y col., 2004b).

También es importante emplear como criterio de selección que las cepas sean viables en condiciones normales de almacenamiento y que permitan su procesamiento industrial con técnicas como el liofilizado (Bálcazar y col., 2006).

Una característica imprescindible de la bacteria probiótica es que no cause daño en la especie de pez en la que se utilizará, esto es particularmente importante si se emplean géneros en los que algunas de sus especies o cepas son consideradas patógenas u oportunistas para los peces, como los géneros *Aeromonas* y *Pseudomonas* (Austin y Austin, 2012; Von Siebenthal y col., 2009).

En el caso de las bacterias Gram-negativas debe tenerse en cuenta la posibilidad de la adquisición de genes de virulencia por transferencia horizontal, aunque hasta la fecha no se ha documentado ningún caso (Kesacordi-Watson y col., 2008). Otro inconveniente a tener en cuenta es la adquisición de genes de resistencia frente a antibióticos, que ya han sido documentados (Newaj-Fyzul y col., 2014).

Una de las formas más comunes de seleccionar bacterias como probióticos es llevar a cabo estudios de inhibición *in vitro* en los que el agente patógeno es expuesto a las bacterias candidatas como probióticas o a sus productos extracelulares en medio líquido o sólido (Pérez-Sánchez y col., 2014).

Existen varios trabajos que tratan sobre el control de *S. parasitica* mediante el empleo de microorganismos. Dentro de las bacterias que han demostrado antagonismo *in vitro* frente a *Saprolegnia* spp. se encuentran las siguientes especies: *Pseudomonas fluorescens* (Hatai y Willoughby, 1988; Bly y col., 1997; Carbajal-González y col., 2011, 2013; Liu y col., 2015); *Alteromonas* sp., *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas saccharophila*, *Aeromonas caviae* y *Aeromonas ecrenophila* (Husseín y col., 2001); *Serratia marcescens* (Zhang y col., 2008); *Bacillus subtilis* (Liu y col., 2011); *Aeromonas media* (Lategan y col., 2003); *Aeromonas sobria*, *Pantoea agglomerans*, *Serratia fonticola*, *Xhantomonas reflexus* y *Yersenia kristensenii* (Carbajal-González y col., 2011, 2013); *Lactobacillus plantarum* (Nurhajati y col., 2012) y *Pseudomonas aeruginosa* (Moghaddan y col., 2012).

Algunos trabajos han comprobado la capacidad de ciertas bacterias para impedir la infección por *S. parasitica in vivo*. Así, Lategan y col. (2004a, 2004b) emplearon *Aeromonas media* A199 para prevenir la saprolegniosis en perca plateada (*Bidyanus bidyanus*) y anguilla australiana (*Anguilla australis*) con éxito. En estudios posteriores determinaron que la sustancia responsable era el indol producido por la bacteria (Lategan y col., 2006).

Heikkinen y col. (2013, 2016) demostraron que la presencia de cepas de *Pseudomonas* sp. y *Janthinobacterium* sp. incrementaba la eficacia del tratamiento del agua con radiación ultravioleta para la prevención de la infección por *Saprolegnia* sp. en huevos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) durante su incubación.

# CAPÍTULO 2

## Planteamiento y objetivos



Mosaico Romano, Museo de Trípoli (cedida por Xavier Sierra autor del blog Un dermatólogo en el museo <http://xsierrav.blogspot.com.es>)



La saprolegniosis es una enfermedad frecuente en el cultivo de salmónidos y otros peces continentales.

Para el tratamiento de la enfermedad se utilizan diversos compuestos químicos que pueden presentar inconvenientes como la presencia de residuos en los tejidos del pez de cara a su consumo, peligrosidad para los piscicultores durante su manejo o repercusiones en el medio ambiente si no se utilizan adecuadamente.

Desde hace unos años la lucha biológica se postula como una posible alternativa al empleo de sustancias químicas para el control de la saprolegniosis, pero a pesar de existir numerosos trabajos sobre bacterias potencialmente probióticas tras los estudios de inhibición *in vitro*, los estudios *in vivo* son muy escasos. Por ello el objetivo principal de esta tesis doctoral es el intento de desarrollar un método de biocontrol de la saprolegniosis, empleando como modelo la trucha arcoíris, partiendo del uso de una serie de aislados bacterianos con capacidad inhibitoria comprobada *in vitro* frente a *Saprolegnia parasitica* en trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación (Carbajal-González y col., 2011, 2013). Para la consecución de este objetivo se han seguido los siguientes pasos:

- ❖ Empleo de bacterias cutáneas de trucha, con capacidad inhibitoria *in vitro* frente a *Saprolegnia parasitica*, para el biocontrol de la infección experimental en trucha arcoíris a través del agua.
- ❖ Comprobar si las bacterias que reducen la saprolegniosis a través del agua pueden resistir las condiciones digestivas de la trucha arcoíris para su administración a través del pienso.
- ❖ Probar si las bacterias cutáneas de trucha con acción probiótica frente a la saprolegniosis en el agua son, asimismo, eficaces en el biocontrol de la enfermedad experimental en trucha arcoíris a través del pienso.
- ❖ Estudiar el modo de acción de aquellas bacterias que tengan mayor capacidad para controlar la saprolegniosis en trucha arcoíris.

Iniciado el desarrollo de esta tesis doctoral se estableció una colaboración dentro de un proyecto de investigación con otros grupos de ictiopatólogos pertenecientes a la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y la Universidad de Zaragoza. Estos investigadores nos cedieron tres cepas probióticas: *Vagococcus fluvialis* L21 y *Enterococcus gallinarum* L1, que han demostrado su capacidad de biocontrol frente a vibriosis en lubina (Sorroza y col., 2012, 2013) y *Lactobacillus plantarum* CLFP3, eficaz en el control de la lactococosis en trucha arcoíris (Pérez-Sánchez, 2011b). Estas bacterias también se han utilizado en el presente trabajo comprobando su eficacia tanto *in vitro* como *in vivo* en el biocontrol de la infección por *Saprolegnia parasitica* en trucha arcoíris. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- ❖ Comprobar su capacidad para inhibir el crecimiento de *S. parasitica in vitro*.
- ❖ Comprobar su capacidad para impedir o disminuir la adhesión de quistes de *S. parasitica* al moco cutáneo.
- ❖ Probar la ausencia de patogenicidad de las dos cepas procedentes de peces marinos (*Enterococcus gallinarum* y *Vagococcus fluvialis*) en trucha arcoíris.
- ❖ Investigar la capacidad de estas cepas probióticas para impedir o disminuir la infección experimental por *S. parasitica* en trucha arcoíris cuando la bacteria se añade al agua o al pienso.

# CAPÍTULO 3

## Material y métodos generales





En este capítulo se describen los materiales y métodos comunes utilizados para el cultivo de *Saprolegnia parasitica* y para los cultivos bacteriológicos.

### 3.1. Material y métodos generales para *Saprolegnia parasitica*

#### *Agar glucosa-peptona (agar GP)*

Se utilizó para el cultivo de *S. parasitica* en medio sólido y la colonización de los cañamones. Su composición es: agar 20 g L<sup>-1</sup>, glucosa 3 g L<sup>-1</sup>, peptona 1 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,128 g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0136 g L<sup>-1</sup>, Ca 8 mg L<sup>-1</sup>, Fe 0,5 mg L<sup>-1</sup>, Mn 0,5 mg L<sup>-1</sup>, Cu 0,1 mg L<sup>-1</sup>, Zn 0,1 mg L<sup>-1</sup> y agua destilada 1 L (Willoughby, 1994).

#### *Cultivo en cañamón*

Se empleó para la obtención de inóculos con micelio de *S. parasitica* y para la producción de zoosporas. Semillas de cáñamo (*Cannabis sativa*), cortadas por la mitad o enteras, se esterilizan a 121 °C durante 20 min eliminándose las que pierden la testa; posteriormente las semillas se incrustan en agar GP sembrado con *S. parasitica* para que el micelio colonice las semillas incubando a 20 °C durante 24 h (Willoughby, 1994).

#### *Cepario de *Saprolegnia parasitica**

Se utilizaron frascos tipo McCartney con un cañamón en su interior y 20 ml de agua destilada que se esterilizaron a 121 °C durante 20 min. Posteriormente se siembran con un inóculo de 3-5 mm de lado de agar GP colonizado por *S. parasitica* incubándose durante 5 días a 20 °C para que el micelio invada el endospermo de la semilla. Finalmente los frascos se conservan en refrigeración a 4 °C (Aller-Gancedo y col., 1999).

#### *Obtención de zoosporas de *Saprolegnia parasitica**

Cañamones colonizados por *S. parasitica* se traspasaron a placas de Petri con 20 ml de agua de río filtrada y estéril (3 mitades de cañamón/placa) incubándose a 20 °C durante 36 horas. Seguidamente se retiraron los cañamones y el agua de las placas se recogió en un matraz empleando un embudo de vástago largo para evitar la agitación de las zoosporas y su enquistamiento, poniendo en el embudo un filtro de celulosa (Whatman 541) para retener el micelio y las zoosporas germinadas.

#### *Recuento de zoosporas*

Una muestra del agua con las zoosporas se introdujo en un frasco de 15 ml agitándola vigorosamente durante unos segundos para inmovilizar las zoosporas y favorecer el recuento utilizando una cámara Hawksley Cristalite B.S. 748 (Hawksley, Londres) de cristal recubierto de rodio con un retículo de 10 mm<sup>3</sup> de capacidad. La concentración de

zoosporas se calculó mediante la media aritmética de los recuentos de tres muestras diferentes de la suspensión de zoosporas.

### 3.2 Material y métodos bacteriológicos generales

#### *Medios de cultivo*

*Agar triptona soja (TSA, Oxoid®)* y *caldo triptona soja (TSB, Oxoid®)*: Se emplearon para el cultivo de las bacterias procedentes de piel de trucha, a excepción de *Lactobacillus plantarum* CLFP3.

*Agar infusión cerebro corazón (agar BHI, Pronadisa®)* y *caldo infusión cerebro corazón (caldo BHI, Pronadisa®)*: Se emplearon para el cultivo de las cepas de origen marino (*Enterococcus gallinarum* L1 y *Vagococcus fluvialis* L21).

*Agar Man Rogosa y Sharpe (agar MRS, Pronadisa®)* y *caldo Man Rogosa y Sharpe (caldo MRS Pronadisa®)*: Se emplearon para el cultivo de *Lactobacillus plantarum* CLFP3.

*Cultivo en caldo triptona peptona neutralizada (caldo TNPB)*: Se empleó para las pruebas de inhibición de *S. parasitica* con sobrenadantes y compuestos proteicos producidos por las bacterias. Composición: triptona 7 g L<sup>-1</sup>, soja peptona neutralizada 5 g L<sup>-1</sup>, cloruro sódico 5 g L<sup>-1</sup> y agua destilada 1 L (Lategan y col., 2006).

#### *Recuentos bacterianos*

Se realizaron con cámara y en placa. Se utilizó una cámara de Neubauer (Albert Sass, Alemania) con un retículo de 0,00025 mm<sup>3</sup> y la concentración bacteriana se obtuvo con la media aritmética de los recuentos de tres muestras diferentes de la suspensión bacteriana. Para los recuentos en placa se efectuaron diluciones decimales seriadas de un cultivo en caldo, sembrando 100 µl de cada dilución en agar por duplicado, extendiendo la suspensión con un asa de Digralsky y cultivando seguidamente 24-48 horas a 20 °C. Finalmente se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) en cada dilución.

# CAPÍTULO 4

Biocontrol de la  
saprolegniosis con  
bacterias cutáneas de  
trucha común *Salmo  
trutta* y trucha arcoíris  
*Oncorhynchus mykiss*,  
aisladas en la provincia de  
León





## 4.1. Biocontrol de la saprolegniosis en trucha arcoíris añadiendo la bacteria potencialmente probiótica al agua

### ▪ 4.1.1. Introducción

En estudios previos de nuestro grupo de investigación se obtuvieron diferentes aislados bacterianos con capacidad para inhibir el crecimiento de *Saprolegnia parasitica in vitro* (Carbajal-González y col., 2011). Posteriormente se comprobó su ausencia de patogenicidad para la trucha arcoíris, su capacidad de adhesión al moco cutáneo y para reducir la adhesión de las zoosporas y quistes de *S. parasitica* en condiciones de exclusión, competición y desplazamiento (Carbajal-González y col., 2013).

Uno de los objetivos del presente trabajo de tesis doctoral es comprobar el potencial de algunas de estas bacterias para su utilización en el biocontrol de la saprolegniosis. En primer lugar se estudió su capacidad para prevenir o reducir la saprolegniosis en trucha arcoíris cuando la bacteria se añade al agua del tanque.

### ▪ 4.1.2. Material y métodos

#### • 4.1.2.1. Bacterias

Se emplearon 15 aislados bacterianos procedentes de la piel de trucha común (*Salmo trutta*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) sanas o con lesiones de saprolegniosis (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Bacterias probadas para el biocontrol de la saprolegniosis a través del agua en trucha arcoíris

Bacteria	Referencia	Origen
<i>Aeromonas sobria</i>	LE51	Trucha común sana
<i>Aeromonas sobria</i>	LE74	Trucha común con saprolegniosis
<i>Aeromonas sobria</i>	LE76	Trucha común con saprolegniosis
<i>Pantoea agglomerans</i>	LE35	Trucha común sana
<i>Pantoea agglomerans</i>	LE36	Trucha común sana
<i>Pantoea agglomerans</i>	LE37	Trucha común sana
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LE89	Trucha común sana
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LE98	Trucha común con saprolegniosis
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LE122	Trucha común con saprolegniosis
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LE141	Trucha arcoíris sana
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LE143	Trucha arcoíris sana
<i>Serratia fonticola</i>	LE52	Trucha común sana
<i>Xhantomonas retroflexus</i>	LE38	Trucha común sana
<i>Yersinia kristensenii</i>	LE54	Trucha común sana
<i>Yersinia kristensenii</i>	LE58	Trucha común sana

Nota: Para más detalles ver Carbajal-González y col. (2011; 2013)

Cada bacteria se preparó para su administración de forma individual. Para ello se sembró en agar TSA cultivando 24 h a 20 °C, se resembró en 500 ml de caldo TSB cultivando 24 h a 20 °C en agitación constante a 120 rpm en un incubador orbital Kuhner shaker (Fisher Scientific). El cultivo resultante se centrifugó a 1000 x g durante 10 min empleando tubos de 50 ml (Falcon®). El sobrenadante se eliminó y el pellet se lavó dos veces con tampón fosfato salino (PBS NaCl 8 g L<sup>-1</sup>, KCl 0,3 g L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O 0,073 g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 0,02 g L<sup>-1</sup>). Seguidamente se realizó el recuento de las bacterias y se ajustó a una concentración de 4 x 10<sup>9</sup> bacterias ml<sup>-1</sup>.

- 4.1.2.2. Preparación de las zoosporas de *Saprolegnia parasitica*

Se empleó el aislado TRU 12 de *S. parasitica* produciendo las zoosporas según la metodología empleada por Fregeneda-Grandes (1998) descrita en material y métodos generales. La suspensión se ajustó para obtener una concentración final de 3 x 10<sup>2</sup> zoosporas ml<sup>-1</sup> en los tanques donde se efectuó la infección de las truchas arcoíris.

- 4.1.2.3. Peces y tanques

Se utilizó trucha arcoíris de 14,81 ± 2,50 g procedente de la piscifactoría comercial Los Leoneses situada en la localidad de Castrillo del Condado (León). Los peces se transportaron en bidones de plástico de 40 L con agua de la piscifactoría suministrándoles oxígeno a través de un difusor cerámico (Rena®) conectado a una bombona de oxígeno de 5 L y 200 bar de presión (SEO S.A.) dotada de un reductor caudalímetro (SEO Minibloc 56) para regular y medir el caudal. Ya en las instalaciones de la Universidad de León se colocaron en un tanque de aclimatación de 120 L con flujo de agua continuo y una tasa de renovación total del agua de 1-1,5 a la hora. Se utilizó agua de un pozo artesiano y filtros de policarbonato de 50, 25 y 5 µm de poro para retener las partículas sólidas en suspensión. Los tanques tenían aireación permanente mediante difusores cerámicos conectados a una bomba de aire electromagnética (EL-120W, Secoh Shangai Mec®) que permitió que la saturación de oxígeno del agua fuera superior al 80 %. La temperatura del agua se mantuvo en torno a los 12 °C mediante un climatizador de agua TR60 (Teco®) y la climatización de la sala. Las truchas se sometieron a un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Los tres primeros días de la aclimatación los peces se mantuvieron en ayuno y recibieron un tratamiento diario con sal (3 g L<sup>-1</sup> de NaCl) mediante baño estático durante 5 minutos, para eliminar posibles hongos o parásitos externos. La aclimatación duró un mínimo de 10 días durante los cuales los peces se alimentaron diariamente con el mismo pienso (Skretting®) utilizado en la piscifactoría de origen, administrándoles el 1 % de su peso vivo. Durante la aclimatación se mantuvieron en observación para comprobar que no manifestaban signos de enfermedad.

En las pruebas experimentales se emplearon tanques de 40 L con flujo de agua continuo con una tasa de renovación de 1,5 a la hora y aireación en las mismas condiciones que

en el tanque de aclimatación. El agua efluente de los tanques se desinfectó con ozono producido por un generador modelo TDZ-O (Todozono, Madrid) antes de proceder a su eliminación.

- 4.1.2.4. Infección experimental con *S. parasitica*

Se utilizaron tanques de 40 L con 20 truchas arcoíris en cada tanque. Los peces fueron sometidos al tratamiento “ami-momi” descrito por Hatai y Hoshiai (1994), que ocasiona estrés y erosiones cutáneas superficiales, lo que favorece la infección por *S. parasitica* en condiciones experimentales. En nuestro caso se utilizaron grupos de 10 truchas que se introdujeron en una malla escurridora empleada en cocina con una rejilla metálica de 7 mm agitándolas durante 2 min antes de devolverlas al tanque (Figura 2).



**Figura 2.** Recipiente empleado para el tratamiento “ami-momi” de las truchas

Seguidamente se añadió al agua la suspensión bacteriana obteniéndose una concentración final en el tanque de  $10^6$  bacterias  $\text{ml}^{-1}$ . De forma simultánea a la administración de la bacteria se añadieron las zoosporas de *S. parasitica* TRU12 para alcanzar una concentración final de  $3 \times 10^2$  zoosporas  $\text{ml}^{-1}$  en el agua del tanque (Figuras 3 y 4).

Durante las 48 horas siguientes a la infección el flujo de agua se mantuvo cerrado para permitir la fijación de las zoosporas a los peces y transcurrido este periodo se reinstauró un flujo de agua de  $1 \text{ L min}^{-1}$ . El tratamiento con la bacteria se aplicó cada 24 horas durante 14 días, manteniéndose el flujo de agua cerrado durante las 6 horas posteriores a la adición de la bacteria. Por cada tanque con el tratamiento experimental con la bacteria se utilizaron otros dos tanques testigo, uno con las zoosporas sustituyendo la bacteria por el mismo volumen de PBS (testigo de infección) y otro solo con tratamiento “ami-momi” sin bacterias ni zoosporas (testigo de mortalidad por “ami-momi”).



**Figuras 3 y 4.** Administración simultánea de la bacteria (Fig.2) y de las zoosporas de *S. parasitica* (Fig.3) en el agua del tanque

Durante los 14 días los peces se mantuvieron bajo vigilancia para detectar la aparición de signos de infección por *S. parasitica*. Las truchas que presentaron signos evidentes se sacaron de los tanques sacrificándose por sobredosificación con anestésico MS222 (100 ppm) contabilizándose como peces con saprolegniosis. Los que murieron en las primeras 24 h se registraron como bajas debidas al tratamiento “ami-momi”, comparándose con las producidas en el testigo “ami momi”.

- 4.1.2.5. Análisis estadístico

Se calculó tasa de supervivencia de los peces con cada bacteria. Se utilizó el test de Fisher de dos vías para comprobar si las diferencias observadas entre los grupos experimentales y los testigos presentaban diferencias estadísticamente significativas. Estos cálculos fueron realizados con el programa Epi Info 7<sup>TM</sup> (CDC).

Con las bacterias en las que los resultados indicaron diferencias estadísticamente significativas se efectuaron tres réplicas para confirmar la capacidad inhibitoria *in vivo* de la correspondiente bacteria.

- 4.1.3. Resultados

Dos de los quince aislados bacterianos, *Pseudomonas fluorescens* LE89 y *Pseudomonas fluorescens* LE141, lograron reducir la infección por *S. parasitica* en trucha arcoíris con valores estadísticamente significativos cuando se añadieron al agua del tanque. Los peces tratados con LE89 tuvieron un porcentaje de no infectados del  $75,50 \pm 14,08$  % ( $p \leq 0,05$ ), y con LE141 del  $57,20 \pm 7,20$  % ( $p \leq 0,05$ ) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Porcentaje de peces no infectados frente a la saprolegniosis en trucha arcoíris tratada con bacterias en el agua, respecto a los testigos. Se representa el valor p del test de Fisher en aquellos que no resultó estadísticamente significativo

Aislado bacteriano añadido al agua	% de peces no infectados
<i>Aeromonas sobria</i> (LE51)	0 %
<i>Aeromonas sobria</i> (LE74)	0 %
<i>Aeromonas sobria</i> (LE76)	0 %
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (LE89)*	75,50 ± 14,08 % (88,9 %, 85,0 %, 52,6 %)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (LE98)	0 %
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (LE122)	10,5 % (p ≥ 0,05)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (LE141)*	57,20 ± 7,20 % (69,0 %, 52,6 %, 50,0 %)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (LE143)	0,3 % (p ≥ 0,05)
<i>Pantoea agglomerans</i> (LE35)	5,0 % (p ≥ 0,05)
<i>Pantoea agglomerans</i> (LE36)	0 %
<i>Pantoea agglomerans</i> (LE37)	15,0 % (p ≥ 0,05)
<i>Serratia fonticola</i> (LE52)	0 %
<i>Yersinia kristensenii</i> (LE54)	0 %
<i>Yersinia kristensenii</i> (LE58)	0 %
<i>Xantomonas reflexus</i> (LE38)	10,0 % (p ≥ 0,05)

\*Se representa la media y desviación de tres estudios independientes (% de no infectados obtenido en cada una de las réplicas)

En todas las infecciones experimentales las primeras lesiones macroscópicas por *S. parasitica* se observaron a las 24-48 horas postinfección, tanto en el tanque con la bacteria como en el testigo con zoosporas. Las lesiones de saprolegniosis se localizaron principalmente en la cabeza, aleta dorsal, aleta adiposa, zona periorbital y opérculos (Figura 5).

Frecuentemente cuando se vio afectado el opérculo la muerte se produjo a las 48-72 horas tras la infección. En algunos peces que solamente tenían afectación uni o bilateral de los ojos habitualmente solo se circunscribía a esta zona corporal. En el resto de las truchas se observaba una progresión de las lesiones con un crecimiento radial y profuso del micelio afectando a grandes áreas de la superficie corporal.

Aunque LE89 y LE141 produjeron índices de supervivencia altos en los peces, en aquellos que se infectaron con *S. parasitica* no se observó mejoría de las lesiones a lo largo de los 14 días postinfección.



**Figura 5.** *Trucha arcoíris* con lesiones típicas de saprolegniosis 72 horas post infección. En un tanque tratado con *Yersenia kristensenii* LE58 en el agua

#### ▪ 4.1.4. Discusión

La protección que proporcionaron LE89 y en menor grado LE141, indica que estas bacterias podrían ser una alternativa interesante como probióticos frente al empleo de tratamientos químicos en la prevención-biocontrol de la saprolegniosis en trucha a través del agua. Por el contrario no parecen ser una buena opción para el tratamiento, ya que una vez que se instauró la infección en el pez no detuvieron ni eliminaron la progresión de la enfermedad. Un aspecto interesante es que ambas bacterias proceden de la microbiota cutánea de peces sanos, un requisito que es recomendable en los probióticos, ya que en el caso de LE89 procede de trucha común y LE141 de trucha arcoíris.

Existen pocos estudios *in vivo* que empleen bacterias probióticas frente a *S. parasitica*. Lategan y col. (2004a y 2004b) demostraron que la administración de *Aeromonas media* en el agua disminuía significativamente la aparición de saprolegniosis en anguila austral (*Aguilla australis*) y en perca plateada (*Bidyanus bidyanus*), además de inducir la curación de lesiones. En los resultados obtenidos empleando LE89 y LE141 no se observó mejoría en las lesiones de los peces tratados.

Respecto al empleo de bacterias potencialmente probióticas frente a la infección por *S. parastica* en huevos de trucha arcoíris existe un estudio *in vivo* en el que Heikkinen y col. (2016) observaron que el tratamiento del agua con *Jathinobacterium* sp. M169, *Pseudomonas* sp. M162 y M174 o sus mezclas, cuando el agua era tratada previamente con radiación ultravioleta disminuía la mortalidad.

A pesar de existir pocos trabajos del empleo de probióticos frente a *S. parasitica in vivo*, como se comentó en el apartado 1.2. existen numerosos trabajos de bacterias capaces de inhibir a *S. parasitica in vitro*.

Otras cepas de *Pseudomonas* sp. han demostrado eficacia *in vivo* frente a otros agentes patógenos en trucha arcoíris, como *Vibrio anguillarum*, cuando son añadidas en el agua

(Gram y col., 1999; Spanggaard y col., 2001), y frente a *Flavobacterium psychrophilum* cuando se añaden en el pienso (Korkea-aho y col., 2011).

El mecanismo de acción de *P. fluorescens* LE89 y LE141 *in vivo* se desconoce, aunque en el apartado 4.3. de este trabajo se pretende vislumbrar. El que la bacteria impida la infección, pero cuando se instaura no evite su progresión, sugiere que la bacteria coloniza el epitelio cutáneo del pez y que mediante exclusión competitiva evita la adhesión de los quistes de *S. parasitica*. Esta hipótesis de la competición quedó demostrada en un trabajo anterior *in vitro* en el que se demostró que ambas bacterias producen un elevado porcentaje en la reducción de la adhesión de los quistes de *S. parasitica* al moco cutáneo de trucha común cuando se añaden de forma simultánea (competición) o previamente a los quistes (exclusión), pero no son capaces de desplazarlos cuando ya se han adherido al moco que tapiza la placa (Carbajal-González y col., 2013). Esto confirmaría lo que ocurrió *in vivo*, puesto que una vez que se instauró la infección, las bacterias no fueron capaces de detenerla o reducirla, sólo cuando actuaron dificultando la adhesión de los quistes evitaron la enfermedad. El mecanismo de exclusión competitiva está ampliamente descrito como uno de los modos de acción de los probióticos mediante el cual evitarían la fijación del microorganismo patógeno a las mucosas del pez, pero a pesar de que existen trabajos *in vitro* que demuestran este efecto, cuando se transfieren a modelos *in vivo*, generalmente no producen resultados que los apoyen (Kesarcodi-Watson y col., 2008).

## 4.2. Biocontrol de la saprolegniosis en trucha arcoíris añadiendo la bacteria potencialmente probiótica al pienso

### ▪ 4.2.1. Introducción

Una de las vías de administración de los probióticos más empleada en acuicultura es a través del pienso. En los objetivos de la tesis doctoral se contempla el comprobar la eficacia por vía oral de aquellas bacterias que sean probióticas a través del agua.

LE89 y LE141, que dieron buen resultado en el agua, proceden del moco cutáneo de trucha y no del intestino. Por ello se optó por comprobar determinadas propiedades en relación con su capacidad para soportar el tránsito a través del aparato digestivo de la trucha, su establecimiento en el moco intestinal, su viabilidad una vez mezcladas con el pienso y la forma más adecuada de conservación, así como el patrón de resistencia a antibióticos. Se realizaron las pruebas siguientes:

1- Resistencia a varios gradientes de pH para evaluar la capacidad de las dos bacterias seleccionadas (LE89 y LE141) para resistir la acción de los ácidos gástricos de la trucha, permitiendo su paso al intestino y posterior colonización.

2- Resistencia a bilis fresca de trucha arcoíris para comprobar la capacidad de las bacterias para sobrevivir al tránsito gastrointestinal.

3- Crecimiento en moco intestinal y moco cutáneo para conocer si las bacterias crecen en ambos mocos lo que indicaría su capacidad para colonizar el tracto intestinal y la superficie cutánea del pez.

4- Patrón de sensibilidad a antibióticos. La resistencia a los antibióticos de las bacterias probióticas presenta la ventaja de que la administración de antibióticos al pez no afectaría a su viabilidad en la microbiota cutánea e intestinal persistiendo su efecto beneficioso, pero presenta la desventaja de que la presencia de resistencias a antibióticos codificadas en plásmidos puede favorecer la transferencia de estas resistencias a otras bacterias del medio.

5- Supervivencia de los aislados bacterianos una vez mezclados con el pienso para poder establecer el método de conservación más adecuado.

▪ 4.2.2. Material y métodos

- 4.2.2.1. Propiedades de *Pseudomonas fluorescens* LE89 y LE141 respecto a su utilización en el pienso:

- 4.2.2.1.1. Resistencia a diferentes pH

La bacteria se cultivó en caldo TSB a 20 °C durante 24 h, se centrifugó a 2000 x g durante 10 min, el pellet resultante se lavó dos veces con PBS estéril. La concentración bacteriana se ajustó a 10<sup>10</sup> bacterias ml<sup>-1</sup> y de esta suspensión se depositaron por triplicado 10 µl en 100 ml de PBS estéril con diferentes pH (3, 4, 5, 6 y 7) obtenidos mediante la adición de HCl 0,1 M. Tras incubar 90 min a 20 °C se determinaron las UFC ml<sup>-1</sup> mediante la siembra en TSA de cuatro diluciones decimales de cada una de las suspensiones a diferentes pH. Finalmente se obtuvo el porcentaje de supervivencia de la bacteria. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), considerando significativos aquellos resultados que presentaran un valor  $p \leq 0,05$ .

- 4.2.2.1.2. Resistencia a bilis fresca

La bilis se obtuvo de hembras de trucha arcoíris de aproximadamente 400 g de peso. Los peces se sometieron a un ayuno previo de 36 h antes de la extracción, momento en el que fueron sacrificados por sobredosisación de anestésico (MS-222, 100 ppm). La bilis se extrajo mediante punción de la vesícula biliar con una aguja de 25 G y se recogió en tubos estériles.

Las suspensiones bacterianas se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior, ajustándose la concentración final a 10<sup>7</sup> bacterias ml<sup>-1</sup>. A esta suspensión bacteriana se le añadió por triplicado un 10 % de bilis fresca procedente de un pool de bilis de tres truchas arcoíris. Las suspensiones se incubaron durante 90 min a

20 °C, después se llevaron a cabo 4 diluciones seriadas 1/10, se tomaron 100 µl de cada una y se sembraron en agar TSA para determinar las UFC ml<sup>-1</sup> y el porcentaje de supervivencia. Como testigo se empleó el mismo volumen de PBS en lugar de bilis.

Los datos obtenidos se interpretaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) considerando significativos aquellos que presentaran un valor  $p \leq 0,05$ .

#### •4.2.2.1.3. Crecimiento en moco intestinal y cutáneo

Se emplearon truchas común y arcoíris de aproximadamente 400 g. El moco cutáneo e intestinal se obtuvo según la metodología descrita por Chabrillón y col. (2005). De modo resumido, se raspa cuidadosamente la superficie cutánea o la mucosa intestinal con una espátula de plástico estéril. El moco se diluye 1:3, se homogeniza en PBS estéril, se centrifuga dos veces a 12 000 x g durante 5 min a 4 °C para eliminar escamas y células y el sobrenadante se filtra con un filtro estéril de 0,45 µm. Finalmente se mide la concentración de proteínas totales con un espectrofotómetro (Nanodrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific®) y se ajusta la concentración a 0,5 mg ml<sup>-1</sup>. La suspensión de ambos tipos de moco se esteriliza mediante la exposición a luz ultravioleta (254 nm) durante 30 min.

Las dos bacterias se cultivaron en caldo TSB en las mismas condiciones descritas anteriormente ajustando la concentración de la suspensión a  $3 \times 10^9$  bacterias ml<sup>-1</sup>. Se tomaron 10 µl de esta suspensión y se añadieron a 3 ml de la suspensión de moco para obtener una concentración final de  $10^7$  bacterias ml<sup>-1</sup>. Se prepararon dos testigos, uno positivo en el que se sustituyó la suspensión de moco por el mismo volumen de TSB y otro negativo en el que se añadió PBS en lugar de la suspensión de moco. Se incubaron a 20 °C durante 24 h en agitación y de cada cultivo se efectuaron cuatro diluciones seriadas 1:10 de las que se tomaron 100 µl para su cultivo en agar TSA y posterior determinación de las UFC ml<sup>-1</sup>.

#### •4.2.2.1.4. Patrón de sensibilidad a antibióticos

Se comprobó mediante el test de sensibilidad bacteriana *in vitro* empleando el método de difusión con discos sobre agar TSA. Se utilizaron los siguientes discos con antibióticos: ácido nalidíxico (30 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25 µg-23,75 µg), doxiciclina (80 µg), florfenicol (30 µg), kanamicina (100 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), cefalexina (30 µg), ampicilina (33 µg), amoxicilina- ácido clavulánico (20 µg-10 µg), penicilina (5 µg), estreptomina (200 µg), clindamicina (25 µg), enrofloxacin (10 µg) y vancomicina (5 µg).

#### •4.2.2.1.5. Supervivencia de la bacteria mezclada con el pienso

La preparación del pienso se llevó a cabo según Irianto y Austin (2002a). La bacteria se sembró en agar TSA incubando a 20 °C durante 48 h. El crecimiento obtenido se trasladó a 500 ml de caldo TSB incubando 24 h en agitación a 20 °C. La suspensión bacteriana se ajustó a una concentración de  $10^9$  bacterias ml<sup>-1</sup>, tomándose un inóculo de

10 ml que se añadió a 90 g de pienso que se homogeneizó mediante un amasador eléctrico (HM 3100, Braun) en un recipiente de cristal estéril durante un minuto. Se utilizaron dos tipos de pienso comercial (T4 Optiline AE Ouro 2P y T4 Optiline-sf 2P, Skretting®) que se diferencian en su flotabilidad. La mezcla de cada pienso con la bacteria se secó durante 30 min en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar (Panigrahi y col., 2004).

De cada lote de pienso se tomó una muestra para calcular las UFC g<sup>-1</sup> iniciales en el mismo, procediéndose del siguiente modo: 10 g del pienso se homogeneizaron con 90 ml de suero fisiológico estéril durante 2 min en un Stomacher® 400 (Seward) y de este homogeneizado se tomaron 100 µl para efectuar ocho diluciones decimales seriadas. Cada una de estas diluciones se sembró en agar TSA y tras una incubación de 48 h a 20 °C se realizó el recuento de colonias.

A continuación, cada una de las mezclas de pienso se dividió en dos mitades de igual peso que se envasaron en bolsas de Whirl-Pak® (Nasco). Cada mitad se almacenó a una temperatura diferente (4 °C y 20 °C) durante 30 días. La supervivencia de las bacterias durante ese periodo de tiempo se comprobó según Irianto y Austin (2002a), determinando las UFC g<sup>-1</sup> a los 7, 14, 21 y 28 días.

- 4.2.2.2. Biocontrol de la saprolegniosis en trucha arcoíris añadiendo *Pseudomonas fluorescens* LE89 o LE141 al pienso

- ♦ 4.2.2.2.1. Bacterias y preparación del pienso.

Se emplearon los aislados *P. fluorescens* LE89 y LE141 que habían protegido frente a la infección por *S. parasitica* administrados en el agua. Las suspensiones bacterianas se prepararon del mismo modo que para el biocontrol de *S. parasitica* en el agua (apartado 4.1.2.1). Seguidamente se mezclaron 10 ml de una suspensión bacteriana de 10<sup>9</sup> bacterias ml<sup>-1</sup> con 90 g de pienso comercial T2 Optiline 1P (Skretting®) empleando una amasadora de varillas eléctrica (HM 3100, Braun) durante un minuto. Para los peces testigo se preparó el pienso de la misma forma sustituyendo el inóculo bacteriano por 10 ml de PBS estéril.

- ♦ 4.2.2.2.2. Peces y tanques

Se utilizó trucha arcoíris de 11,79 ± 4,17 g y la aclimatación, tanques y procedimiento experimental se realizó del mismo modo que se describe en el apartado 4.1.2.3.

- ♦ 4.2.2.2.3. Administración de la bacteria probiótica y desafío con *S. parasitica*

Se utilizaron tanques de 40 L con 20 truchas que durante los 14 días previos y los 10 posteriores a la infección con *S. parasitica* se alimentaron con pienso T2 Optiline 1P (Skretting®) mezclado con la bacteria a una concentración de 10<sup>8</sup> bacterias g<sup>-1</sup>. Los peces se alimentaron con una cantidad de pienso correspondiente al 2 % de la biomasa del tanque.

Durante las 48 h previas a la infección y durante la misma, los peces se mantuvieron en ayunas. Tras 24 h en contacto con los quistes de *S. parasitica* se reestableció el flujo de agua en el tanque y la alimentación con la bacteria. La infección con *S. parasitica* se llevó a cabo según se describe en el apartado 4.1.2.4. Se prepararon 2 tanques testigo utilizando un pienso en el que se sustituyó la bacteria por el mismo volumen de PBS estéril, y durante la infección uno de los tanques recibió el mismo tratamiento con zoosporas (testigo de infección) y otro solo el tratamiento “ami-momi” (testigo de mortalidad por “ami-momi”).

Los peces se mantuvieron en observación durante 10 días para detectar signos de saprolegniosis y los que murieron en las 24 horas posteriores a la infección experimental fueron considerados como bajas debidas al tratamiento “ami-momi”.

♦ 4.2.2.2.4. Análisis estadístico

Se calculó el porcentaje de peces no infectados y se analizaron los datos mediante el test de Fisher de dos vías para determinar si las diferencias observadas entre los grupos experimentales y testigos eran estadísticamente significativas. Estos cálculos fueron realizados con el programa Epi Info 7<sup>TM</sup> (CDC).

▪ 4.2.3. Resultados

- 4.2.3.1. Propiedades de *Pseudomonas fluorescens* LE89 y LE141 respecto a su utilización en pienso

♦ 4.2.3.1.1. Resistencia a diferentes pH

Ambas bacterias presentan viabilidad con todos los pH probados, aunque con pH 3 hubo diferencias significativas de menor viabilidad ( $p \leq 0,05$ ) respecto al testigo con pH 7 (Cuadros 3 y 4). El porcentaje de bacterias capaces de resistir a pH 3 es mayor en LE141 siendo próximo al 20 %, mientras que en LE89 apenas llega al 2 %.

**Cuadro 3.** Tolerancia, expresada en log UFC ml<sup>-1</sup>, de *Pseudomonas fluorescens* LE89 a diferentes concentraciones de pH, en tres experimentos independientes

	Log UFC ml <sup>-1</sup>			$\bar{x} \pm SD$
<b>pH 3</b>	5,21	5,25	5,76	5,41 ± 0,25*
<b>pH 4</b>	7,39	7,33	7,27	7,33 ± 0,04
<b>pH 5</b>	7,29	7,29	7,27	7,28 ± 0,01
<b>pH 6</b>	7,23	7,29	7,26	7,26 ± 0,02
<b>pH 7</b>	7,38	7,42	7,36	7,39 ± 0,02

\* Indica que existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) respecto al testigo (pH 7)

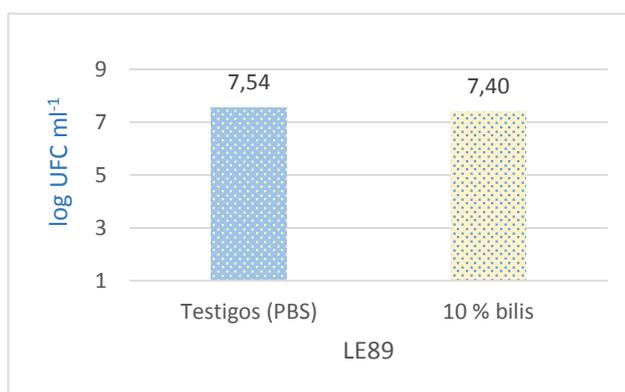
**Cuadro 4.** Tolerancia, expresada en log UFC ml<sup>-1</sup>, de *Pseudomonas fluorescens* LE141 a diferentes concentraciones de pH, en tres experimentos independientes

	Log UFC ml <sup>-1</sup>			$\bar{x} \pm SD$
<b>pH 3</b>	-	6,25	6,26	6,26 ± 0,01*
<b>pH 4</b>	6,93	6,95	6,95	6,94 ± 0,01
<b>pH 5</b>	7,02	6,99	6,82	6,94 ± 0,09
<b>pH 6</b>	6,99	7,16	7,02	7,06 ± 0,07
<b>pH 7</b>	6,94	7,06	7,03	7,01 ± 0,05

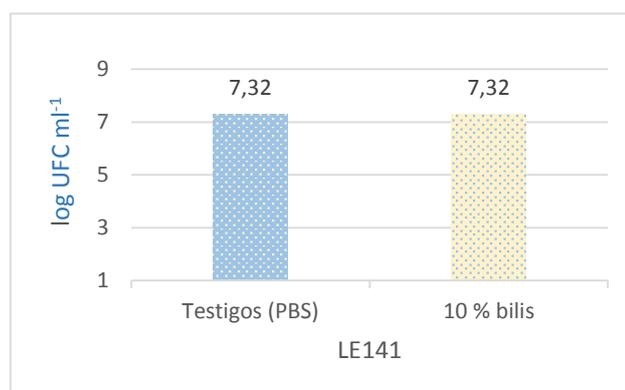
\* Indica que existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) respecto al testigo (pH 7)

• 4.2.3.1.2. Resistencia a bilis fresca

Tanto LE89 como LE141 presentaron buena resistencia frente a la bilis de trucha arcoíris puesto que no hubo diferencias significativas en el crecimiento ( $p \leq 0,05$ ) en los cultivos con bilis respecto a los testigos (Figuras 6 y 7). En el caso de LE141 el porcentaje medio de supervivencia respecto a los testigos fue de un 99,5 %, mientras que con LE89 fue del 71,7 %.



**Figura 6.** Log UFC ml<sup>-1</sup> de *Pseudomonas fluorescens* LE89 incubada con un 10 % de bilis de trucha arcoíris, se representa la media de tres estudios independientes. Las desviaciones  $\leq 0,1$  no se hallan respresentadas en el gráfico



**Figura 7.** Log UFC ml<sup>-1</sup> de *Pseudomonas fluorescens* LE141 incubada con un 10 % de bilis de trucha arcoíris, se representa la media de tres estudios independientes. Las desviaciones  $\leq 0,1$  no se hallan respresentadas en el gráfico

•4.2.3.1.3. Crecimiento en moco intestinal y cutáneo

LE89 y LE141 crecen en el moco intestinal y en el moco cutáneo de trucha común y trucha arcoíris empleándolos como fuente de nutrientes. LE89 aumentó su crecimiento hasta en dos unidades logarítmicas respecto al testigo negativo, y en el caso de LE141 aumentó una unidad logarítmica (Cuadros 5 y 6).

**Cuadro 5.** Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* LE89 en moco cutáneo e intestinal de trucha común (macho y hembra) y trucha arcoíris (hembra), expresado en log UFC ml<sup>-1</sup>

	Log UFC ml <sup>-1</sup>
Moco cutáneo trucha común ♂ (pool 3 peces)	8,64
Moco cutáneo trucha común ♀ (pool 3 peces)	8,65
Moco cutáneo trucha arcoíris ♀ (pool 2 peces)	8,53
Moco intestinal trucha común ♂ (pool 3 peces)	8,52
Moco intestinal trucha común ♀ (pool 3 peces)	8,52
Moco intestinal trucha arcoíris ♀ (pool 2 peces)	8,52
Testigo + (TSB)	9,04
Testigo – (PBS)	6,63

**Cuadro 6.** Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* LE141 en moco cutáneo e intestinal de trucha común (macho y hembra) y trucha arcoíris (hembra), expresado en log UFC ml<sup>-1</sup>

	Log UFC ml <sup>-1</sup>
Moco cutáneo trucha común ♂ (pool 3 peces)	8,26
Moco cutáneo trucha común ♀ (pool 3 peces)	8,23
Moco cutáneo trucha arcoíris ♀ (pool 2 peces)	8,19
Moco intestinal trucha común ♂ (pool 3 peces)	8,30
Moco intestinal trucha común ♀ (pool 3 peces)	8,14
Moco intestinal trucha arcoíris ♀ (pool 2 peces)	8,45
Testigo + (TSB)	8,32
Testigo – (PBS)	7,00

•4.2.3.1.4. Patrón de sensibilidad a antibióticos

LE89 y LE141 resisten a la mayoría de los antibióticos empleados, aunque existen variaciones en función de la bacteria. Ambas son resistentes a florfenicol, eritromicina, cefalexina, ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, penicilina, clindamicina y vancomicina (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Sensibilidad de *Pseudomonas fluorescens* LE89 y LE141 a diversos antibióticos. R: resistente, S: sensible. Entre paréntesis se indica el diámetro del halo de inhibición en cm

Antibiótico	LE89	LE141
Ácido nalidíxico	R (1,1)	S (2,0)
Tetraciclina	S (2,5)	R (0,0)
Trimpetroprim-sulfametoxazol	R (0,0)	S (2,3)
Doxicilina	S (4,0)	S (3,7)
Florfenicol	R (0,0)	R (0,0)
Kanamicina	S (3,7)	S (2,7)
Eritromicina	R (0,0)	R (0,0)
Gentamicina	S (3,0)	S (2,5)
Cefalexina	R (0,0)	R (0,0)
Ampicilina	R (0,0)	R (0,0)
Amoxicilina-ácido clavulánico	R (0,0)	R (0,0)
Penicilina	R (0,0)	R (0,0)
Estreptomina	S (4,0)	R (1,9)
Clindamicina	R (0,0)	R (0,0)
Enrofloxacina	S (3,5)	S (2,5)
Vancomicina	R (0,0)	R (0,0)

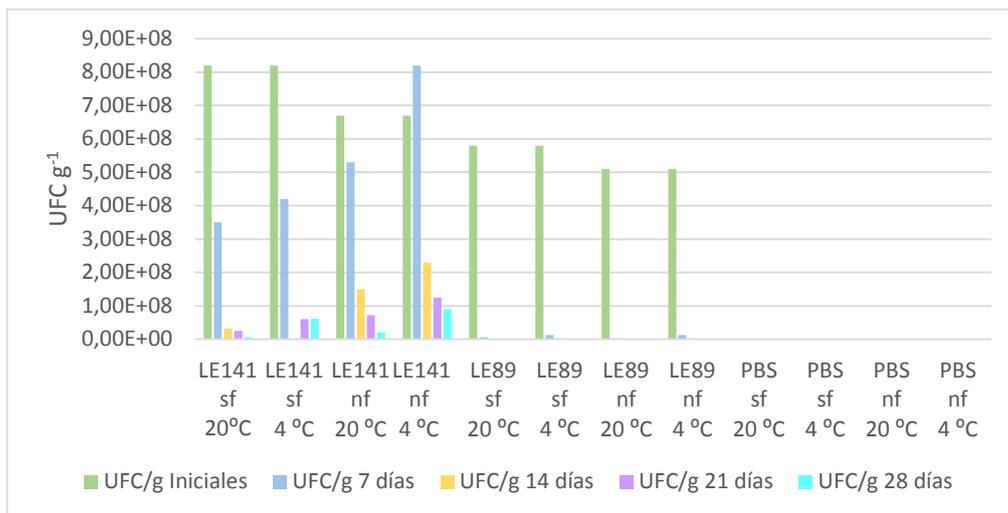
#### •4.2.3.1.5. Supervivencia en el pienso

En general las dos bacterias resistieron más cuando se mezclaron con el pienso T4 Optiline AE Ouro 2P (no flotante) y a su vez cuando el pienso se almacenó a 4 °C. LE141 presentó en general una supervivencia mayor que LE89.

LE141 experimentó un descenso aproximado de una unidad logarítmica a las dos semanas de almacenamiento y a partir de ese momento su concentración en el pienso permaneció bastante estable hasta los 28 días.

LE89 presentó un descenso de una o dos unidades logarítmicas a los 7 días de almacenamiento y este descenso continuó de forma progresiva hasta el día 28. A su vez fue más acusado cuando la bacteria se añadió al pienso T4 Optiline-sf 2P (semiflotante) y se almacenó a 20 °C (Figura 8).

Todas las mezclas con el pienso T4 Optiline-sf 2P conservado a 20 °C, incluidos los testigos, desarrollaron macroscópicamente un hongo del género *Penicillium* a los 28 días de almacenamiento.



**Figura 8.** UFC g<sup>-1</sup> de las cepas LE141 y LE89 en dos tipos diferentes de pienso T4 Optiline AE Ouro 2P (nf) T4 Optiline-sf 2P (sf) y sus testigos (PBS), almacenados a 4 °C y 20 °C, durante 28 días (UFC g<sup>-1</sup>)

- 4.2.3.2. Biocontrol de la saprolegniosis en trucha arcoíris añadiendo *Pseudomonas fluorescens* LE89 o LE141 al pienso

Durante los ensayos ninguno de los dos aislados de *P. fluorescens*, LE89 y LE141, aumentó el porcentaje de peces no infectados a través del pienso frente a la infección experimental con *S. parasitica*, ya que no hubo diferencias con respecto a los peces infectados en el tanque testigo (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Porcentaje de peces no infectados frente a la saprolegniosis en trucha arcoíris alimentada con *Pseudomonas fluorescens* LE89 y LE141

Aislado bacteriano añadido al pienso	% de peces no infectados
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (LE89)	0 %
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (LE141)	0 %

#### ▪ 4.2.4. Discusión

La disminución de pH afecta de manera diferente a LE89 y a LE141, pero en general las dos presentan una supervivencia superior al 80 % a valores de pH 4, aunque sufren un descenso drástico de su viabilidad al ser sometidas a pH 3.

Hay que tener en cuenta que la acción de los ácidos gástricos *in vivo* no se produce de forma directa sobre las bacterias al estar mezcladas con el alimento. Según algunos autores el pH gástrico con el quimo en el estómago se ve incrementado al llegar a valores de pH 3,80 (Sugiura y col., 2006) o 4,90 (Bucking y Wood, 2009) en trucha arcoíris. Estos autores asocian este incremento al efecto tampón de los componentes del pienso y a un efecto reflejo de los peces, mediante el cual ingieren ciertas cantidades de agua durante la ingestión que diluiría los ácidos gástricos.

LE89 y LE141 toleran la presencia de bilis lo que es importante de cara a la supervivencia durante su paso por el intestino, si bien según Bálcazar y col. (2008) no

existe consenso acerca de la concentración de bacterias probióticas que deben sobrevivir al proceso de digestión.

LE89 y LE141 presentan capacidad para multiplicarse en el moco cutáneo e intestinal de trucha arcoíris y trucha común facilitando la colonización de la superficie cutánea y de la mucosa intestinal. Nikoskelainen y col. (2001) indican que mediante la adhesión y colonización de la mucosa intestinal, la superficie cutánea o las branquias los probióticos actuarían frente al agente patógeno de diferentes formas: bloqueando receptores, ocupando espacios de la mucosa o compitiendo por los nutrientes presentes en el medio, dando lugar a una exclusión competitiva. También se ha propuesto como modo de acción de los probióticos la inmunomodulación de la respuesta inmunitaria en el hospedador (Nayak, 2010; Lazado y col., 2014).

A esta facilidad de crecimiento en el moco cutáneo se le uniría la mayor o menor capacidad de adhesión al mismo demostrado en estudios *in vitro* previos llevados a cabo con estas cepas por Carbajal-González (2013). LE89 se adhirió un 2,9 % al moco cutáneo de trucha común macho y LE141 fue el aislado bacteriano con mayor capacidad de adhesión (15,3 %) de los 15 empleados.

La resistencia de los probióticos a determinados antibióticos puede suponer una ventaja si se administran de forma simultánea, puesto que estos microorganismos beneficiosos se establecerían en la mucosa intestinal o superficie cutánea mientras que los microorganismos perjudiciales para el pez serían eliminados (Pérez-Sánchez y col., 2011). Además las dos bacterias estudiadas presentaron resistencia frente al florfenicol, que en este momento es uno de los antibióticos autorizados para el uso en trucha arcoíris por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS, 2017). Debido a que ambas bacterias pertenecen a la especie *Pseudomonas fluorescens* y por tanto son bacterias Gram-negativas, estudios posteriores deben asegurar que los genes que codifican la resistencia al florfenicol y otros antibióticos se hallan codificados en el cromosoma y no en plásmidos, lo que permitiría una transferencia de esta resistencia a otras bacterias mediante transmisión horizontal, lo que supondría un serio hándicap para su posible uso comercial (Newaj-Fyzul y col., 2014).

En los ensayos de supervivencia utilizando dos tipos de pienso comercial para trucha, se observó que transcurridos 7 días de almacenamiento del pienso la concentración de las dos bacterias disminuía considerablemente, siendo más acusado cuando el pienso se conservó a 20 °C. Por eso se consideró que para los experimentos de biocontrol de la saprolegniosis lo más apropiado era realizar la mezcla de la bacteria con el pienso inmediatamente antes de administrarlo a los peces, y que una vez comprobada la utilidad de la vía oral se ensayarían métodos alternativos para su conservación y almacenamiento, como la liofilización o la encapsulación. Esta última presentaría además la ventaja de que las bacterias encapsuladas resistirían mejor el tránsito intestinal estando protegidas del efecto de los ácidos estomacales, sales biliares y enzimas digestivas (Rosas-Ledesma y col., 2012; Burgain y col., 2011).

Finalmente LE89 y LE141 no resultaron eficaces para prevenir la infección por *S. parasitica* cuando se administraron de modo independiente a través del pienso, en contraste con los resultados obtenidos al administrarlas en el agua del tanque, lo que reafirma la importancia de la vía de administración.

Gram y col. (2001) indican que el probiótico debe administrarse de tal modo que permanezca en el área de invasión y proliferación del microorganismo patógeno. Esto explicaría que LE89 y LE141 sean efectivas al ser añadidas al agua, ya que las zoosporas secundarias de *S. parasitica* se fijan al epitelio cutáneo y branquial de los peces, pero excepcionalmente no al epitelio intestinal.

Nuestros resultados ponen de relevancia que la acción a nivel local del probiótico en el punto de acceso del patógeno debe tenerse en cuenta, sobre todo considerando que uno de los modos de acción en probióticos descritos con más frecuencia es la exclusión competitiva.

Hasta la fecha no existen trabajos que empleen bacterias con actividad inhibitoria frente a *S. parasitica in vivo* administradas a través del pienso, pero sí existen numerosos estudios que emplean probióticos con éxito por vía oral para prevenir enfermedades bacterianas en trucha arcoíris (Irianto y Austin, 2002a; Brunt y Austin, 2005).

Smith y Davey (1993) comprobaron que *Pseudomonas fluorescens* F19/3 era capaz de excluir a *Aeromonas salmonicida* en las infecciones inducidas por estrés administrada a través del agua, por su capacidad por competir por el hierro, y porque el agente patógeno se encuentra situado externamente en el pez. Austin y col. (1995) comprobaron la efectividad de otro probiótico de la especie *Vibrio alginolyticus* administrado mediante baño para reducir la infección por *A. salmonicida* en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), sin embargo este probiótico administrado por la misma vía no fue capaz de controlar la infección por *Yersinia ruckeri*, en el que se ha descrito el intestino como una importante puerta de entrada en el hospedador. (Valtonen y col., 1992).

A pesar de considerar que la efectividad de los probióticos depende entre otros factores de su vía de administración, Korkea-Aho y col. (2011) demostraron que el empleo de la cepa de *P. fluorescens* M174 a través del pienso era capaz de disminuir la mortalidad causada por *Flavobacterium psychrophilum* en trucha arcoíris. Esta bacteria, causante del síndrome del alevín de la trucha arcoíris, ha sido detectada por varios autores en aletas, branquias, moco cutáneo, opérculos y órganos sexuales en reproductores (Holt y col., 1993; Nematollahi y col., 2003). En estudios posteriores también se ha detectado su presencia en la mucosa intestinal de alevines de trucha arcoíris (Lorenzen y col., 1994; Lorenzen y Olesen, 1997), de esta forma *P. fluorescens* M174 se encontraría colonizando una de las áreas de invasión este agente patógeno.

A pesar de ello, Pieters y col. (2008) demostraron que no es necesario emplear como vía de administración del probiótico aquella que proporcione una interacción directa con el

patógeno, al contrario de lo sucedido en nuestro caso, puesto que la administración oral de *Aeromonas sobria* GC2 en trucha arcoíris redujo la infección por *Ichthyophthirius multifiliis* que se localiza en la piel. Este trabajo indica que la acción frente al agente causante del punto blanco no tiene lugar por exclusión competitiva del probiótico, si no por una estimulación de la respuesta inmunitaria; lo que pone de relevancia la importancia de conocer el modo de acción de los probióticos y la patogenia del microorganismo patógeno para la selección del probiótico frente a una enfermedad concreta.

### 4.3. Estimulación de la respuesta inmunitaria y otros mecanismos de acción de *Pseudomonas fluorescens* LE89 y LE141

- 4.3.1. Introducción

Uno de los mecanismos de acción de los probióticos más investigado es la estimulación de la respuesta inmunitaria inespecífica en el hospedador (Pieters y col., 2008; Kim y Austin, 2006; Son y col., 2009; Panigrahi y col., 2004; Balcázar y col., 2006;). Dados los resultados positivos obtenidos con la administración de *Pseudomonas fluorescens* LE89 o LE141 en el agua, nos propusimos estudiar si estas bacterias estimulan la respuesta inmunitaria en trucha arcoíris. También se han descrito otros mecanismos de acción de los probióticos como p.ej. la producción y secreción de compuestos bioactivos con propiedades inhibitorias (Lategan y col., 2006; Whang y Zhang, 2017). Por todo ello se planteó la realización de diferentes experimentos para tratar de determinar el modo de acción de LE89 y LE141. De este modo, se ha estudiado su capacidad para estimular la respuesta inmunitaria en trucha arcoíris, la producción de sideróforos y la presencia o producción de sustancias tanto estructurales (presentes en su citoplasma) como extracelulares con capacidad inhibitoria.

- 4.3.2. Material y métodos

- 4.3.2.1. Estimulación de la respuesta inmunitaria innata en trucha arcoíris añadiendo LE89 o LE141 al agua

Todos los ensayos se efectuaron por triplicado con trucha arcoíris de  $71,83 \pm 9,90$  g en tanques de 40 L con las mismas condiciones descritas en el apartado 4.1.2.3. En cada tanque se dispuso un grupo de 12 peces que se sometieron a un tratamiento diario de  $10^6$  bacterias  $\text{ml}^{-1}$  en el agua del tanque durante 6 h. Transcurrido el baño con la bacteria LE89 o LE141 se restableció el flujo de agua y se alimentó a los peces con el pienso T-4 Optiline-sf 2P (Skretting®), con una cantidad correspondiente al 2 % del peso vivo de los peces. Los tanques testigo se prepararon con las mismas condiciones que los experimentales, pero añadiéndoles PBS estéril en lugar de la suspensión bacteriana. Transcurridos 14 días se muestrearon un total de 12 peces (4 peces de cada una de las tres réplicas) que se anestesiaron con 50 ppm de MS-222 tomando muestras de sangre

de la vena caudal y de moco cutáneo. Posteriormente estos peces se sacrificaron por sobredosis con 100 ppm de MS-222 y se recolectaron los macrófagos del pronefros.

Para determinar la estimulación de la inmunidad innata se midieron los siguientes parámetros: recuento de células sanguíneas (eritrocitos, leucocitos, y proporción de linfocitos, granulocitos, y monocitos), capacidad fagocitaria y producción de ión superóxido de los macrófagos del pronefros, proteínas totales y actividad de la lisozima del suero y del moco cutáneo.

Los recuentos de células sanguíneas se llevaron a cabo según la metodología descrita por Pieters y col. (2008). Para la obtención de las muestras de sangre los peces se anestesiaron mediante inmersión en agua con 50 ppm de MS-222, y de forma inmediata se llevó a cabo la venopunción de la vena caudal con una jeringa de insulina acoplada a una aguja de 25 G. Una parte de la sangre obtenida se transfirió a un Vacutainer® heparinizado (Becton-Dickinson) y el resto se depositó en un tubo eppendorf que se reservó para la obtención de suero. A partir de la sangre heparinizada se llevaron a cabo tres diluciones decimales en PBS estéril (pH 7,2), tomando la dilución  $10^{-2}$  para el recuento de leucocitos y la dilución  $10^{-3}$  para el recuento de eritrocitos. Los recuentos se efectuaron en una cámara de Neubauer a 400 aumentos. Para determinar la proporción de los diferentes leucocitos (linfocitos, granulocitos y monocitos) se efectuó una extensión en un portaobjetos de la sangre heparinizada, se tiñó empleando el método Diff-Quick, se observó a 400 aumentos al microscopio óptico contando por triplicado 100 leucocitos y se determinó la proporción de cada uno de los mismos.

La obtención de los macrófagos se realizó según Fierro-Castro (2009). Para ello se sacrificaron las truchas mediante una sobredosis de MS-222 (100 ppm) y se exanguinaron. Posteriormente se extrajo el pronefros en condiciones estériles dentro de una cabina de flujo laminar. El tejido del pronefros se puso en una placa de Petri estéril con medio de mantenimiento para macrófagos [RPMI 1640 sin rojo fenol (Gibco) con un 2 % de suero fetal bovino (SFB), 50  $\mu$ g/ml de gentamicina y 2  $\mu$ g/ml de anfotericina, suplementado con 20 UI de heparina]. El pronefros se disgregó empleando tijeras estériles, se homogeneizó con una jeringa de 1 ml y se filtró a través de una malla de nylon de 100  $\mu$ m para eliminar porciones de tejido groseras. A continuación la suspensión de células se depositó lentamente formando una capa en la superficie de un gradiente discontinuo de Percoll® (GE Healthcare) formado por 10 ml de una fase del 51 % de Percoll (5,1 ml de Percoll, 1 ml de HBSS 10x y 3,9 ml de agua destilada estéril) en el fondo de un tubo estéril de 15 ml (BD) y sobre esta 10 ml de una fase de 34 % de Percoll (3,4 ml de Percoll, 1 ml de HBSS 10x y 5,6 ml de agua destilada estéril). El gradiente de Percoll se centrifugó a 400 x g durante 25 min a 4 °C y se recogió con una pipeta Pasteur la banda de células presente en la interfase de los dos gradientes. Las células obtenidas se lavaron dos veces con RPMI-1640 centrifugando a 400 x g durante 5 min a 4 °C. Tras el último lavado se resuspendieron en el medio de mantenimiento para macrófagos sin heparina y se tomó una alícuota para establecer el

número de células viables mediante la adición de azul tripán al 0,1 % y su posterior recuento en una cámara de Neubauer.

El ensayo de la capacidad fagocitaria de los macrófagos del pronefros se efectuó según Mathews y col. (1990) con ligeras modificaciones. Se ajustó la concentración de macrófagos del pronefros a  $10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$  en medio RPMI-1640, 1 ml de esta suspensión se dispuso en un tubo de poliestireno estéril y se le añadió 1 ml con  $10^9$  bolitas de látex de  $0,85 \mu\text{m}$  de diámetro (Sigma) resuspendidas en 1 ml de RPMI-1640. Los tubos se incubaron durante 1 h a  $20^\circ\text{C}$  en una estufa para cultivos celulares, en condiciones de aerobiosis con un 5 % de  $\text{CO}_2$ . Tras la incubación se añadió 1 ml de PBS estéril recién descongelado y se centrifugaron los tubos a  $275 \times g$  durante 5 min. Los sobrenadantes se eliminaron y los pellets obtenidos se extendieron sobre portaobjetos, se dejaron secar al aire y se tiñeron con Diff-Quick. Los portaobjetos se examinaron a 400 aumentos al microscopio y se contabilizaron por triplicado grupos de 100 células para determinar el porcentaje de macrófagos que engloban bolitas de látex calculándose el índice de fagocitosis (IF) según la siguiente fórmula:

$$\text{IF} = (\text{Número de macrófagos fagocitando} / \text{Número total de macrófagos}) \times 100$$

La detección de ión superóxido se llevó a cabo según Chung y Secombes (1988). Para ello en una placa de 96 pocillos (Nalge Nunc) se depositaron  $100 \mu\text{l}$  de una suspensión de macrófagos con una concentración de  $10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$  en medio de mantenimiento para macrófagos (sin heparina), suplementado con suero fetal bovino al 0,1 % para favorecer la adherencia de las células al poliestireno. Tras incubación a  $20^\circ\text{C}$  durante 2 h en aerobiosis con un 5 % de  $\text{CO}_2$ , los pocillos se lavaron dos veces con RPMI-1640 para eliminar las células no adheridas. La monocapa de células adheridas al pocillo se cubrió con  $100 \mu\text{l}$  de medio RPMI-1640 suplementado con  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  de cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT, Sigma) y  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma) disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma). Tras incubación durante 1 h a  $20^\circ\text{C}$  se eliminó el sobrenadante cuidadosamente y la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) se frenó mediante la adición de metanol absoluto. El formazán resultante del estado reducido del NBT de color azul se disolvió en  $120 \mu\text{l}$  de  $\text{KOH } 2 \text{ M}$  y  $140 \mu\text{l}$  de DMSO. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro Multiskan<sup>TM</sup> (Thermo Scientific<sup>®</sup>) a  $620 \text{ nm}$  cada 10 min durante 1 h, usando  $\text{KOH}$  y DMSO como blancos.

La actividad de la lisozima en el suero sanguíneo y el moco cutáneo se midió basándose en la capacidad de la lisozima para lisar la bacteria *Micrococcus lysodeikiticus*. El protocolo empleado fue el descrito por Lange y col. (2001). Se extrajo sangre de la vena caudal, se dejó desuerar 12 h a  $4^\circ\text{C}$  y se centrifugó a  $2000 \times g$  durante 10 min. A continuación en una placa de 96 pocillos se añadió en unos pocillos  $100 \mu\text{l}$  del suero y en otros  $100 \mu\text{l}$  de cuatro diluciones seriadas dobles (1:5-1:40) en tampón fosfato salino. Seguidamente a cada pocillo se añadió  $100 \mu\text{l}$  de una suspensión con *M. lysodeikiticus* liofilizado (Sigma) resuspendido en PBS a una concentración de  $0,4 \text{ mg ml}^{-1}$ . Como

testigo positivo el suero se sustituyó por 1,6  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de lisozima de huevo blanco y 4 diluciones dobles de esta y como testigo negativo el suero se sustituyó por tampón fosfato. La placa se incubó a 20 °C durante 1 h y se midió la densidad óptica (Multiskan™ GO, Thermo Fisher Scientific) a 570 nm a los 0, 15, 30, 45 y 60 min. Posteriormente se establecieron las unidades lisozima que se definen como la cantidad de suero que es capaz de disminuir la densidad óptica de la muestra a 0,001  $\text{min}^{-1}$ . Para determinar la misma característica en el moco cutáneo este se obtuvo mediante el raspado de la superficie cutánea del pez con el borde de un portaobjetos estéril. El moco se homogeneizó con PBS estéril y se centrifugó dos veces a 27 000 x g durante 15 minutos a 4 °C para eliminar partículas y restos celulares. La preparación se hizo según Ellis (1990), para ello se homogeneizó con 4 partes (peso/volumen) de PBS 0,004 M, se centrifugó a 10 000 x g durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante para llevar a cabo la determinación de la actividad de la lisozima del mismo modo que para el suero sanguíneo.

La determinación de proteínas totales en el suero sanguíneo y el moco cutáneo se efectuó empleando la absorbancia a 280 nm en un Nanodrop ND-1000 (Thermo scientific). La estimación de la concentración de proteínas en una muestra empleando la espectrofotometría se basa en que los enlaces peptídicos absorben a una longitud de onda del espectro ultravioleta de 280 nm, incluso a bajas concentraciones, de manera proporcional a su concentración. Como testigos se emplearon muestras de albúmina sérica bovina (BSA) de concentración conocida.

Para el análisis estadístico de los resultados de las distintas pruebas relacionadas con la estimulación del sistema inmunitario se usó el análisis de la varianza (ANOVA) no paramétrica de Krukall-Wallis para los datos en los que se obtuvo la mediana y los rangos. Los datos continuos y los porcentajes se analizaron mediante el test de ANOVA de una sola vía. Los porcentajes se transformaron previamente en datos continuos mediante el cálculo de su arco-seno. Los datos se consideraron significativos cuando se obtuvo una  $p \leq 0,05$  (Pieters y col., 2008; Zar, 1984).

- 4.3.2.2. Producción de sideróforos

La producción de sideróforos de LE89 y LE141 se determinó según Del Río (2004) empleando el medio agar CAS-HDTMA incubando a 20 °C y observando los cambios de color en el medio a las 24 y 48 h. La detección mediante este método consiste en que el compuesto formado por CAS-Fe (III)-HDTMA presenta un color azul y cuando existe la presencia de sideróforos estos captan el  $\text{Fe}^{3+}$  provocando un cambio de color en el medio del azul al amarillo.

Para la elaboración del agar CAS-HDTMA se prepararon inicialmente 3 soluciones. La CAS (0,00605 g de chromo-azurol S en 5 ml de agua destilada), la solución de cloruro férrico (100  $\mu\text{l}$  de HCl 1N, 0,02703 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , completando hasta 100 ml con agua destilada) y la solución de HDTMA (0,00729 g de bromuro de hexadeciltrimetilamonio en 4 ml de agua destilada). Posteriormente se mezclan 5 ml de

la solución CAS con 1 ml de la solución de cloruro férrico y se añaden 4 ml de la solución de HDTMA. Esta mezcla se añade lentamente a 90 ml de agar TSA y se autoclava a 121 °C durante 15 min. Una vez atemperado finalmente se añaden 100 µl de una solución 0,1 M de 2,2-dipiridilo (Sigma) antes de dispensar el medio.

- 4.3.2.3. Sustancias inhibidoras de *S. parasitica* presentes en las células y sobrenadantes de LE89 y LE141

Para la obtención de las células bacterianas, LE89 y LE141 se sembraron por separado en 3 ml de TSB incubando durante una noche a 20 °C; 500 µl de la suspensión bacteriana se transfirieron a 250 ml de TSB incubando nuevamente a 20 °C en un agitador orbital a 200 rpm hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento lo que ocurrió aproximadamente a las 24 h. Este cultivo se centrifugó a 1000 x g durante 15 min para eliminar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en suero fisiológico estéril y se ajustó a una concentración de  $2 \times 10^5$  bacterias ml<sup>-1</sup> ( $4 \times 10^5$  bacterias ml<sup>-1</sup> para la inhibición de la germinación de los quistes) mediante lectura de la densidad óptica a 540 nm (Multiskan™ GO, Thermo Fisher Scientific), equivalente a recuentos previos realizados mediante la cámara de Neubauer. Tomando la concentración de  $2 \times 10^5$  bacterias ml<sup>-1</sup> ( $4 \times 10^5$  bacterias ml<sup>-1</sup> para la inhibición de la germinación de los quistes) como la inicial se efectuaron otras 5 diluciones seriadas 1:10 en suero fisiológico estéril. De cada una de las diluciones bacterianas se obtuvieron tres alícuotas, una que no se modificó y las otras dos que se trataron a 70 °C durante 1 h y 100 °C durante 5 min, respectivamente. Con cada una de las diluciones bacterianas se comprobó la inhibición de *S. parasitica* en medio líquido con cañamón y la inhibición de la germinación de los quistes.

Los sobrenadantes de LE89 y LE141 se prepararon según Lategan y col. (2006). Cada bacteria se sembró en 3 ml de TSB que se incubó a 20 °C durante una noche. De este cultivo se tomó una alícuota de 250 µl que se transfirió a 200 ml de caldo TNPB y que se incubó a 25 °C durante 36 h en un agitador orbital a 200 rpm. El cultivo obtenido se centrifugó a 15 000 x g durante 20 min y el sobrenadante obtenido se pasó a través de un filtro de 0,22 µm (Acrodisc®) para eliminar las posibles bacterias presentes en el sobrenadante. Partiendo del sobrenadante inicial se efectuaron 3 diluciones dobles en TNPB, cada una se dividió en tres fracciones y, como en el caso de las células, una no se trató, la segunda fue sometida a 70 °C durante una hora y la tercera a 100 °C durante 5 min. Como en el caso anterior se probó la inhibición frente a *S. parasitica* en medio líquido con cañamón y la inhibición de la germinación de los quistes.

Para la extracción de los compuestos citoplasmáticos y los restos celulares de LE89 y LE141 las bacterias se obtuvieron como se describe para la obtención de células bacterianas al comienzo de este apartado. La concentración se ajustó a  $2 \times 10^5$  bacterias ml<sup>-1</sup>. Se prepararon alícuotas de estos cultivos a las que se les añadió un tercio de su volumen en perlas de vidrio de 0,17 mm para su homogenización en un homogeneizador FastPrep-24® aplicando 10 pulsos de 45 s cada uno. Seguidamente se centrifugó a 1000 x g para separar el contenido citoplásmico de los restos celulares y

estos últimos se resuspendieron en suero fisiológico estéril igual al volumen inicial de la alícuota. Seguidamente se comprobó la inhibición del crecimiento del micelio de *S. parasitica* en cañamón y de la germinación de los quistes.

Con las células, sus componentes y los sobrenadantes se comprobó la inhibición de *S. parasitica* en medio líquido con cañamón utilizando placas de cultivo celular de 24 pocillos (Falcon®), poniendo en cada pocillo medio cañamón con *S. parasitica*, 1 ml de TSB y 1 ml de cada una de las diluciones de las bacterias. Para los sobrenadantes tratados o no térmicamente y los contenidos citoplásmicos o restos celulares se dispusieron 2 ml de estos y medio cañamón colonizado. Todos los pocillos se prepararon por duplicado y se establecieron controles positivos en los que se sustituyeron las bacterias por 1 ml de suero fisiológico, los sobrenadantes por 2 ml de TNPB, y los contenidos citoplasmáticos o restos celulares por 2 ml de suero fisiológico; y controles negativos sustituyendo el cañamón colonizado por uno sin *S. parasitica*. Seguidamente se incubó a 20 °C durante 3 días y se observó el crecimiento macroscópico y microscópico del micelio con un microscopio invertido Nikon Diaphot.

Las pruebas de inhibición de la germinación de los quistes se realizaron de la misma manera que la inhibición del crecimiento del micelio en medio líquido añadiendo 0,5 ml de la dilución bacteriana y sustituyendo el cañamón con micelio de *S. parasitica* por 0,5 ml de una suspensión de zoosporas con una concentración de  $4 \times 10^4$  zoosporas  $\text{ml}^{-1}$  y en el caso de los sobrenadantes y contenidos citoplasmáticos y restos celulares se añadieron 1 ml de estos y 1 ml de la misma concentración de zoosporas. Se prepararon testigos positivos en los que se sustituyó la solución bacteriana, restos celulares y contenido citoplásmico por suero fisiológico y los sobrenadantes por TNPB y testigos negativos en los que se añadió agua de río filtrada estéril en lugar de la suspensión de zoosporas.

Para el estudio de los compuestos de naturaleza proteica presentes en los sobrenadantes se siguió la técnica utilizada por Lategan y col. (2006) empleando dos medios de cultivo, TNPB tal como lo describen estos autores y TSB. Las proteínas presentes en los sobrenadantes se sometieron a una precipitación con sulfato amónico según Wang y Zhang (2017) con ligeras modificaciones, inicialmente con sulfato amónico al 80 % de saturación y una vez comprobada la actividad inhibitoria *in vitro* frente *S. parasitica* se procedió con una precipitación secuencial de las proteínas del sobrenadante con una saturación al 30, 45, 60 y 80 %. Todas las fracciones precipitadas se centrifugaron a  $14\,000 \times g$  durante 20 min y se desalaron para eliminar el sulfato amónico resuspendiéndolas en 2 ml de PBS y pasándolas a través de una minicolumna de Sephadex G-21 (PD-10) previamente equilibrada con PBS (Rodríguez-Aparicio y col., 1992). De cada eluido obtenido de las diferentes fracciones se comprobó su capacidad de inhibición frente a *S. parasitica in vitro* (del micelio en cañamón y la germinación de los quistes) y de aquellos que inhibieron se midió la concentración de proteínas totales mediante Nanodrop® ND-1000 y la técnica descrita por Bradford (1976). A su vez estos eluidos se analizaron para conocer el número de proteínas presentes y estimar el peso

molecular de las mismas. Esto se hizo según la metodología descrita por Laemmli (1970) mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) el gel de poliacrilamida se empleó a una concentración del 12 % y el gel concentrador al 3 %, empleando unas condiciones de electroforesis a 200 V durante 75 min. El gel resultante de la electroforesis se tiñó con Coomassie blue y el peso molecular de las proteínas separadas se estimó a partir del marcador de proteínas de bajo peso molecular (LMW-SDS, GE Healthcare). En el caso de LE89 se comprobó si el eluido de la fracción del 30 % de precipitación presentaba sideróforos, lo que se hizo añadiendo 1 ml del eluido a 1 ml de medio CAS en el que se sustituyó el TSA por TSB.

▪ 4.3.3. Resultados

• 4.3.3.1. Estimulación de la respuesta inmunitaria

Los resultados de los diferentes parámetros analizados se presentan en los Cuadros 9 y 10.

**Cuadro 9.** *Parámetros de la respuesta inmunitaria innata en trucha arcoíris cuando se administra Pseudomonas fluorescens LE89 en el agua. Los datos se representan como la mediana (mínimo: máximo)*

Parámetro (unidad)	LE89	Testigo
Eritrocitos (x 10 <sup>9</sup> células ml <sup>-1</sup> )	4,96 (3,83:7,00)	4,96 (1,75:7,67)
Leucocitos (x 10 <sup>7</sup> células ml <sup>-1</sup> )	1,79 (6,67:2,83)	1,29 (0,58:2,42)
Linfocitos (%)	92 (68:100)	84 (67:100)
Neutrófilos (%)	8 (0:32)	12 (0:33)
Monocitos (%)	0 (0:8)	0 (0:4)
Actividad lisozima suero (U ml <sup>-1</sup> )	7,75 (6,12:12,98)*	9,78 (4,30:17,87)
Actividad lisozima moco cutáneo (U ml <sup>-1</sup> )	10,96 (8,10:23,88)	13,17 (7,59:19,71)
Concentración de proteínas en el suero (mg ml <sup>-1</sup> )	35,53 (25,63:43,42)*	38,79 (37,76:44,28)
Concentración de proteínas en el moco cutáneo (mg ml <sup>-1</sup> )	40,79 (18,54:86,40)	43,67 (9,70:96,08)

\* Valores que presentaron diferencias estadísticamente significativas

**Cuadro 10.** *Parámetros de la respuesta inmunitaria innata en trucha arcoíris cuando se administra Pseudomonas fluorescens LE141 en el agua. Los datos se representan como la mediana (mínimo: máximo)*

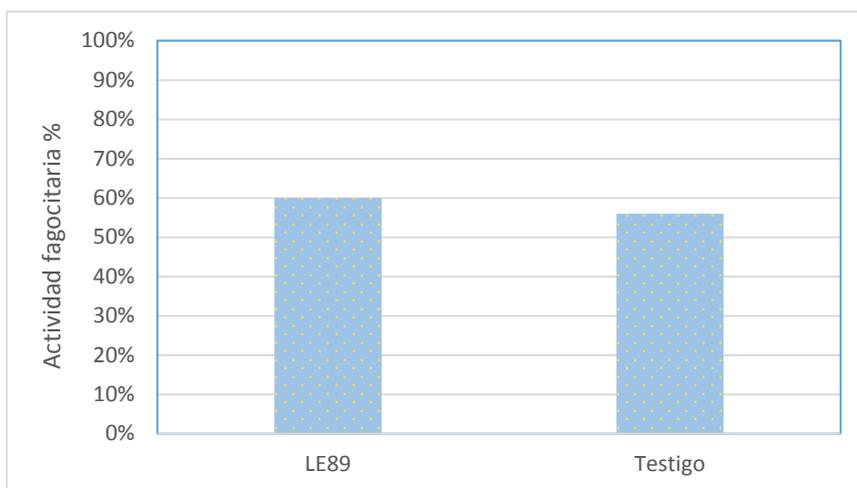
Parámetro (unidades)	LE141	Testigo
Eritrocitos (x 10 <sup>9</sup> células ml <sup>-1</sup> )	3,00 (1,42:4,67)	3,31 (1,25:6,42)
Leucocitos (x 10 <sup>7</sup> células ml <sup>-1</sup> )	1,13 (0,5:2,92)	1,62 (0,75:9,17)
Linfocitos (%)	84 (64:96)	80 (64:92)
Neutrófilos (%)	12 (0:28)	16 (8:36)
Monocitos (%)	8 (0:12)*	0 (0:8)
Actividad lisozima suero (U ml <sup>-1</sup> )	9,75 (5,56:15,50)*	14,08 (9,70:29,51)
Actividad lisozima moco cutáneo (U ml <sup>-1</sup> )	51,07(16,19:65,31)	59,83 (23,47:80,14)
Concentración de proteínas en el suero (mg ml <sup>-1</sup> )	37,21(31,95:42,99)*	31,73 (9,60:37,31)
Concentración de proteínas en el moco cutáneo (mg ml <sup>-1</sup> )	46,08(29,36:111,40)	50,22(35,36:130,94)

\* Valores que presentaron diferencias estadísticamente significativas

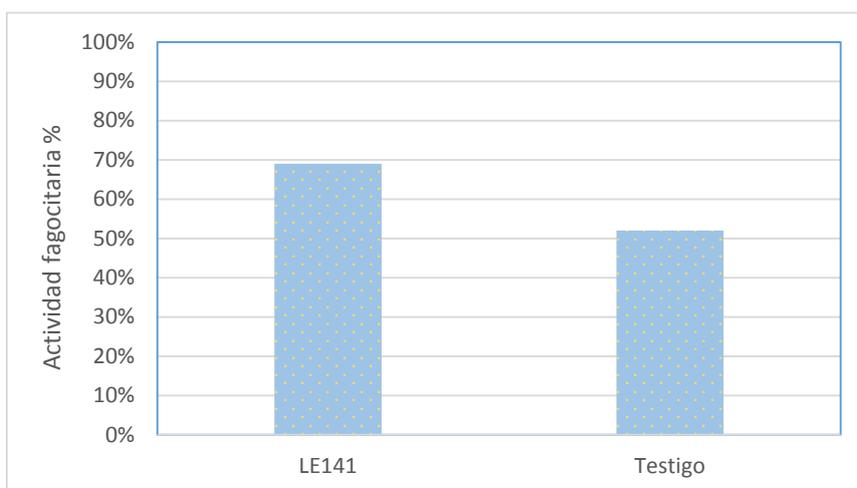
En los recuentos de eritrocitos y leucocitos no se observaron diferencias significativas entre los peces tratados con las bacterias en el agua y los testigos.

Dentro de las subpoblaciones leucocitarias los linfocitos se presentaron como la subpoblación leucocitaria más abundante, y la administración de las bacterias probióticas no supuso diferencias significativas respecto a los testigos. Los neutrófilos fueron la siguiente subpoblación en cuanto a su cantidad, pero tampoco existieron diferencias significativas respecto a los testigos. En el caso de los monocitos que suponen la población de leucocitos menos abundante se observaron diferencias significativas en los peces tratados con LE141 respecto a los testigos.

Los resultados de la actividad fagocitaria de los macrófagos del pronefros se muestran en las figuras 9 y 10. En el caso de LE89 no se encontraron diferencias significativas con los testigos, pero con LE141 sí las hubo.

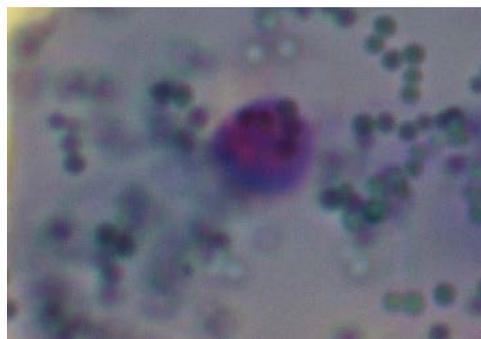


**Figura 9.** Actividad fagocitaria de los macrófagos del pronefros de trucha arcoíris a la que se administró *Pseudomonas fluorescens* LE89 en el agua del tanque. Los datos se presentan como la media de los porcentajes de tres réplicas experimentales (desviaciones  $\leq 0,10$  % no se representan)



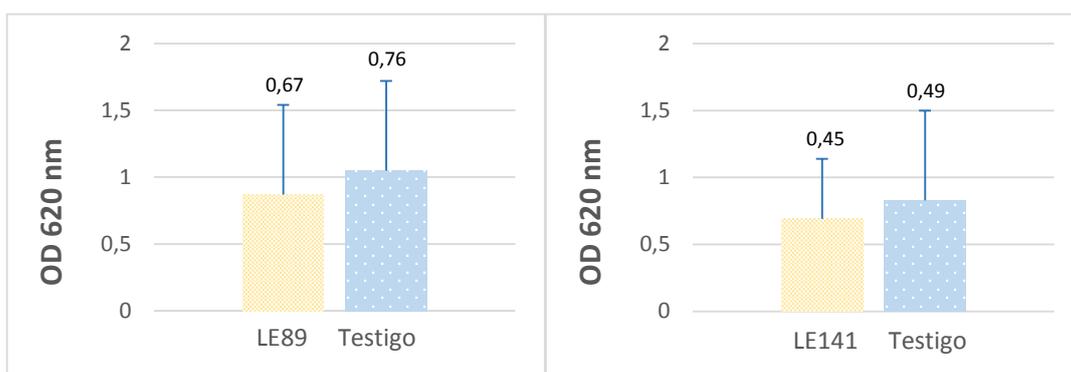
**Figura 10.** Actividad fagocitaria de los macrófagos del pronefros de trucha arcoíris a la que se administró *Pseudomonas fluorescens* LE141 en el agua del tanque. Los datos se presentan como la media de los porcentajes de tres réplicas experimentales (desviaciones  $\leq 0,10$  % no se representan)

En la figura 11 se observa un macrófago del pronefros de trucha arcoíris tratada con LE141 en el agua del tanque.



**Figura 11.** Macrófago de trucha arcoíris fagocitando bolitas de látex (tinción Diff-Quick)

Respecto a la explosión respiratoria de los macrófagos del pronefros las dos bacterias presentaron valores menores que los testigos, aunque con ninguna se observó una diferencia estadísticamente significativa (Fig. 12).



**Figura 12.** Explosión respiratoria de los macrófagos del pronefros en trucha arcoíris a la que se le administró *Pseudomonas fluorescens* LE89 o LE141 en el agua del tanque. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas.

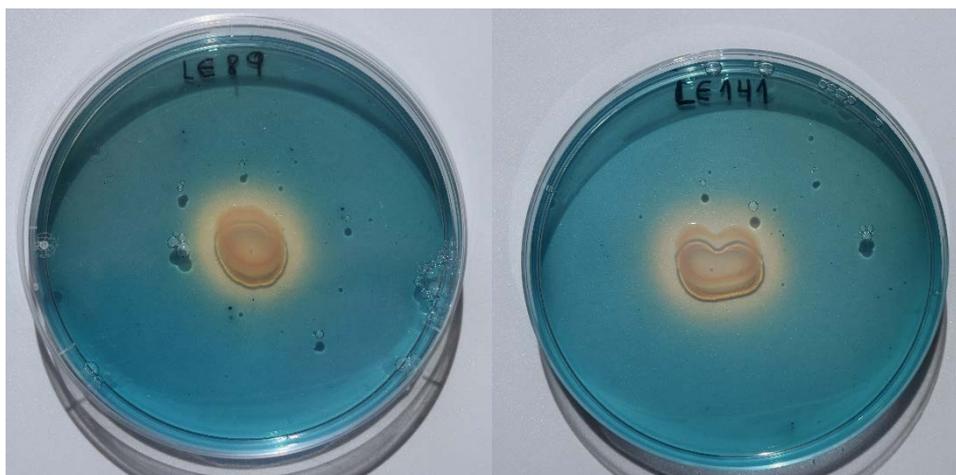
En cuanto a la actividad de la lisozima del suero sanguíneo las diferencias respecto a los testigos fueron significativas con las dos bacterias, pero en ambos casos los niveles de actividad fueron mayores en los peces testigo que en los tratados con *P. fluorescens* LE89 y LE141. Respecto a la actividad de la lisozima del moco cutáneo con ninguna de las dos bacterias se obtuvieron diferencias significativas respecto a los testigos, aunque los valores de estos en ambos casos fueron superiores a los de los peces tratados, como ocurrió con la lisozima del suero.

Sobre la concentración de proteínas totales del suero en ambos casos se observaron diferencias significativas (Cuadros 9 y 10). Con LE89 los peces testigo presentaron concentraciones superiores a los peces tratados, mientras que por el contrario con LE141 se vio un incremento significativo en los tratados respecto a los testigos.

Respecto a la concentración de proteínas totales en el moco cutáneo, con las dos bacterias se vieron concentraciones superiores en las truchas testigo, pero las diferencias no fueron significativas con respecto a las tratadas con LE89 o LE141.

- 4.3.3.2. Producción de sideróforos

Los cultivos en agar CAS demostraron que tanto LE89 como LE141 producen sideróforos. Con ambas bacterias se observó el cambio de la coloración del medio CAS, de azul a amarillo, en las primeras 24 h de incubación (Fig. 13).



**Figura 13.** Producción de sideróforos por *Pseudomonas fluorescens* LE89 y LE141 en el medio CAS

- 4.3.3.3. Sustancias inhibidoras de *S. parasitica* presentes en las células y sobrenadantes de LE89 y LE141

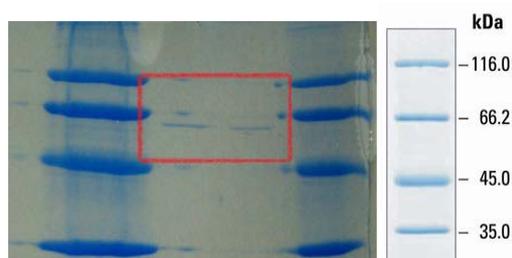
Las células de LE89 y LE141 sin ningún tipo de tratamiento térmico dieron un nivel alto de inhibición tanto del crecimiento del micelio en cañamón como de la germinación de los quistes de *S. parasitica*. En este sentido se consideró inhibición alta la ausencia total de crecimiento en la primera dilución a los tres días de incubación a 20 °C y baja cuando se presentó crecimiento macroscópico parcial del micelio en la misma dilución (Carbajal-González, 2013). Cuando las células se sometieron al tratamiento térmico de 70 °C durante 1 h o de 100 °C durante 5 min, ninguna de las bacterias inhibió el crecimiento del micelio ni la germinación de los quistes.

Los sobrenadantes sin tratamiento térmico de ambas bacterias produjeron una inhibición baja tanto en el crecimiento del micelio como en la germinación de los quistes. Por el contrario, cuando los sobrenadantes se sometieron al tratamiento térmico el efecto inhibitorio desapareció (Cuadros 11 y 12).

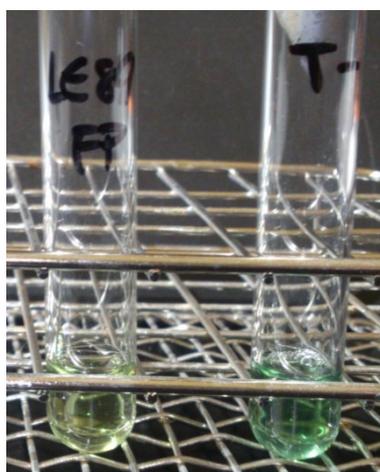
En cuanto a los compuestos presentes en los restos celulares y el contenido citoplasmático de las células bacterianas ninguno de ellos controló el crecimiento del micelio en cañamón en medio líquido ni la germinación de los quistes de *S. parasitica*, ni en los componentes de forma nativa ni en los tratados con altas temperaturas.

El eluido de la precipitación de las proteínas del sobrenadante del cultivo obtenidas con una saturación del 80 % de sulfato amónico proporcionó una inhibición alta del desarrollo del micelio y de la germinación de los quistes. A su vez las fracciones proteicas obtenidas por una precipitación a una saturación del 30 % del sobrenadante de LE89 y la comprendida entre el 45 y 60 % de LE141 produjeron una alta inhibición del desarrollo del micelio de *S. parasitica* y de la germinación de sus quistes. La concentración de proteínas totales en el eluido obtenido del sobrenadante fue de  $0,21 \pm 0,02 \text{ mg ml}^{-1}$  para LE89 y  $0,12 \pm 0,01 \text{ mg ml}^{-1}$  para LE141.

Respecto a la electroforesis, la fracción correspondiente al 45-60 % de LE141 mostró una única banda peptídica (Fig. 14), cuyo peso molecular se estimó aproximadamente en unos 66,0 kDa; este péptido sería el responsable de la inhibición de *S. parasitica* cuando se emplea sobrenadante. En el caso de LE89 no se observó ningún péptido a pesar de obtener concentraciones de proteína mayores en la fracción analizada, posiblemente debido a que las proteínas presentes en esta fracción son de bajo peso molecular y la sensibilidad de la técnica no permite su visualización. Al intentar detectar si el tipo de péptido presente en el eluido de esa fracción se correspondía con sideroforos, se observó un cambio de coloración en el medio CAS caldo a los pocos minutos, lo que indica que los sideróforos presentes en el eluido captan el hierro en su estado reducido produciendo un viraje del color azul del medio a amarillento (Fig. 15).



**Figura 14.** Péptido presente en la fracción del 45-60 % de precipitación proteica del sobrenadante de LE141 (gel de poliacrilamida)



**Figura 15.** Cambio de color en el medio CAS, que indica la presencia de sideróforos, al añadir el eluido de la fracción proteica del 30 % de LE89 que inhibe a *S. parasitica*

**Cuadro 11.** Resultados de las pruebas de inhibición del crecimiento del micelio de *Saprolegnia parasitica* en cañamón utilizando *Pseudomonas fluorescens* LE89 y LE141

Bacteria	Actividad inhibitoria de las células			Actividad inhibitoria del sobrenadante			Actividad inhibitoria de la membrana celular			Actividad inhibitoria del contenido citoplasmático de las células		
	Sin tratamiento	Tratamiento 70 °C 1 h	Tratamiento 100 °C 5 min.	Sin tratamiento	Tratamiento 70 °C 1 h	Tratamiento 100 °C 5 min.	Sin tratamiento	Tratamiento 70 °C 1 h	Tratamiento 100 °C 5 min.	Sin tratamiento	Tratamiento 70 °C 1 h	Tratamiento 100 °C 5 min.
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89	Alta (20) <sup>1</sup>	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Baja <sup>2</sup>	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LE141	Alta (20) <sup>1</sup>	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Baja <sup>2</sup>	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio

<sup>1</sup> Inhibición alta indica ausencia total de crecimiento de *S. parasitica* en la primera dilución a los tres días. Entre paréntesis el número mínimo de células que produce inhibición

<sup>2</sup> Inhibición baja indica una inhibición parcial del crecimiento macroscópico en la primera dilución

**Cuadro 12.** Resultados de las pruebas de inhibición de la germinación de los quistes de *Saprolegnia parasitica* utilizando *Pseudomonas fluorescens* LE89 y LE141

Bacteria	Actividad inhibitoria de las células			Actividad inhibitoria del sobrenadante			Actividad inhibitoria de la membrana celular			Actividad inhibitoria del contenido citoplasmático de las células		
	Sin tratamiento	Tratamiento 70 °C 1 h	Tratamiento 100 °C 5 min.	Sin tratamiento	Tratamiento 70 °C 1 h	Tratamiento 100 °C 5 min.	Sin tratamiento	Tratamiento 70 °C 1 h	Tratamiento 100 °C 5 min.	Sin tratamiento	Tratamiento 70 °C 1 h	Tratamiento 100 °C 5 min.
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89	Alta (20) <sup>1</sup>	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Baja <sup>2</sup>	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LE141	Alta (20) <sup>1</sup>	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Baja <sup>2</sup>	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio	Sin efecto inhibitorio

<sup>1</sup> Inhibición alta indica ausencia total de crecimiento de *S. parasitica* en la primera dilución a los tres días. Entre paréntesis el número mínimo de células que produce inhibición

<sup>2</sup> Inhibición baja indica una inhibición parcial del crecimiento macroscópico en la primera dilución

#### ▪ 4.3.4. Discusión

La acción de LE89 y LE141 frente a *S. parasitica* mediante la estimulación de la respuesta inmunitaria inespecífica parece poco probable, puesto que nuestros resultados de estimulación son contradictorios en función de los parámetros analizados, en parte debido a la gran variabilidad individual en los peces. Sólo es destacable el aumento de monocitos, de la capacidad fagocitaria de los macrófagos y de la concentración de proteínas séricas con LE141. Nuestros resultados difieren de los obtenidos por Giri y col. (2012), que administrando una bacteria del género *Pseudomonas* observaron un incremento en la actividad lisozima, la explosión respiratoria y la actividad fagocitaria en *Labeo rohita*, si bien administraron el probiótico con el pienso. Sin embargo los datos obtenidos por Korkea-aho y col. (2011) al administrar *Pseudomonas* sp. M174 en el pienso, no evidenciaron inmunoestimulación en los recuentos de células sanguíneas, explosión respiratoria de los macrófagos, actividad fagocitaria y actividad lisozima en suero y moco intestinal, a pesar de prevenir la flavobacteriosis en trucha arcoíris.

Salinas y col. (2006) sugieren que la administración de bacterias obtenidas de las superficies del mismo tipo de pez en el que se emplean no provoca una fuerte reacción del sistema inmunitario al estar presentes de forma habitual en su ambiente. Ello coincide con la poca estimulación producida por LE89 y LE141 las cuales proceden de la superficie cutánea de trucha común y trucha arcoíris.

La estimulación de parámetros como la actividad de la lisozima en el moco cutáneo no produciría gran efecto en la prevención de la saprolegniosis, porque *Saprolegnia* parece evitar la acción de ciertas moléculas con actividad antimicrobiana presentes en el moco cutáneo (lisozima e inmunoglobulinas), ya que según Pickering (1994) en la práctica no existen evidencias de que estas sustancias tengan un efecto protector frente a este tipo de infección en los peces.

Sin embargo la estimulación de la actividad fagocitaria de los macrófagos en el caso de LE141 podría presentar algún efecto, ya que Bly y col. (1994) describieron en pez gato (*Ictalurus punctatus*) que la respuesta inmunitaria de tipo celular frente a *S. parasitica* es eficaz cuando las hifas son destruidas por macrófagos activados fusionados en lo que se conoce como células gigantes multinucleadas, pero los resultados no serían comparables a los de una infección en la naturaleza debido a que inyectan intramuscularmente hifas de *S. parasitica*.

Otro de los métodos de acción descrito en probióticos es la exclusión competitiva por la ocupación de sitios de unión de los patógenos, así *P. fluorescens* LE141 ha demostrado su adhesión al moco cutáneo de trucha, impidiendo la fijación de los quistes de *Saprolegnia parasitica*, como quedó comprobado por Carbajal-González (2013). Según su estudio cantidades iguales o superiores a  $2,5 \times 10^4$  bacterias reducía de forma significativa la adhesión de los quistes de *S. parasitica* al moco cutáneo de macho de trucha común (*Salmo trutta*).

Dentro de la exclusión competitiva esta puede tener lugar por la captación por parte del probiótico de nutrientes necesarios para el desarrollo del agente patógeno.

La disponibilidad de hierro es un factor limitante para el crecimiento de los microorganismos (Dreschsel y Jung, 1998). Varios autores han descrito como mecanismo de acción del género *Pseudomonas* la competición con otros microorganismos mediante la reducción del hierro a través de la producción de sideróforos (Smith y Davey, 1993; Gram y col., 1999; 2001, y Korkea-aho, 2011). Matthijs y col. (2007) demostraron la presencia de dos tipos diferentes de sideróforos en *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400, una pioverdina y una quinilobactina asociadas al efecto antifúngico de esta bacteria frente a un oomiceto del género *Pythium*.

Smith y Davey (1993) consideraron que la competición por el hierro libre presente en el medio era responsable de la inhibición de *Aeromonas salmonicida* por parte de tres pseudomonas fluorescentes aisladas del moco cutáneo y las branquias de *Salmo trutta*. Dentro de esas tres bacterias *Pseudomonas fluorescens* F19/3 fue la que redujo con mayor eficiencia la furunculosis en *Salmo salar* al añadirla al agua por lo que sugirieron que el modo de acción de este probiótico es la exclusión de *Aeromonas salmonicida* de la superficie externa del pez.

En nuestro caso tanto *Pseudomonas fluorescens* LE89 como *Pseudomonas fluorescens* LE141 produjeron sideróforos, lo que concuerda con lo dicho por los autores citados anteriormente, lo que sugiere que puede ser uno de los mecanismos que explicarían la acción inhibitoria de estas bacterias sobre *Saprolegnia parasitica*.

Cuando se realizó la inhibición del crecimiento del micelio y la germinación de los quistes de *S. parasitica* empleando células y sobrenadantes o los mismos inactivados por calor, nuestros resultados con células y sobrenadantes sin inactivar coincidieron con los resultados obtenidos por Carbajal-González y col. (2013) en los que observó que las células y sobrenadantes no tratados con calor inhibían a *S. parasitica*.

La ausencia de actividad inhibitoria de LE89 y LE141 *in vitro*, tanto de las células como de los sobrenadantes cuando son sometidos a elevadas temperaturas, indica que la sustancia o sustancias responsables de la inhibición presenta una composición de carácter proteico. Comparando estos resultados con los de detección de sideróforos de este trabajo y los obtenidos por otros autores, uno de los mecanismos que producirían la inhibición sería la producción de sideróforos, cuya estructura es la de un péptido no ribosomal que por tanto sería desnaturalizado al ser sometido a elevadas temperaturas, perdiendo su función y por tanto su capacidad inhibitoria.

Al analizar las sustancias de carácter proteico presentes en los sobrenadantes se observó que en LE89 las proteínas presentes con actividad inhibitoria podrían ser sideróforos y en LE141 además de los sideróforos debería estudiarse con mayor profundidad una proteína de unos 66 kDa presente en la fracción responsable de la inhibición. Al igual que nuestros resultados para LE141 Wang y Zhang. (2017) han aislado una única banda

en la electroforesis en gel de poliacrilamida, que se corresponde con un péptido de unos 58 kDa procedente del sobrenadante de la ruptura celular de *Pseudomonas protegens*; estos autores además han comprobado que el péptido purificado produce inhibición *in vitro* de la germinación de los quistes de *S. parasitica* y que esta inhibición desaparece cuando el péptido es sometido a temperaturas superiores a 50 °C.

Diversos estudios sobre el modo de acción probiótica de *Pseudomonas* sp. han descrito la producción de proteínas con variada naturaleza y efectos.

Se ha descrito la presencia de un lipopéptido surfactante con efecto sobre *Saprolegnia* spp. (Liu y col., 2015), así como otros lipopéptidos capaces de actuar frente a otros oomicetos patógenos para plantas, los cuales provocan que las hifas se hinchen y se quiebren, ocasionando lisis e inhibición de la germinación de los quistes (de Bruijn y col., 2007; 2008; Van de Mortel y col., 2009).

Bly y col. (1997) asociaron la acción de *P. fluorescens* frente a *S. parasitica* a la acción de una hidrolasa de gelatina; pero sugirieron que esa actividad también podría deberse a la acción de una celulasa, cuya producción por parte de algunas cepas de *P. fluorescens* fue descrita por Yamane y Suzuki (1988). Bly y col (1997) consideraron que el efecto de hidrólisis sobre la celulosa de la pared celular de *S. parasitica* sería la responsable del efecto inhibitorio, pero estudios posteriores de estos autores empleando celulasa frente a *S. parasitica in vitro* no encontraron evidencias de inhibición por parte de la enzima.

También se han descrito otros compuestos producidos por *P. fluorescens* con posible efecto frente a microorganismos como sustancias con efecto antibiótico (Takemoto y col., 1995, Gurusiddaiah y col., 1986) y cianida (Askeland y Morrison, 1983).

# CAPÍTULO 5

Biocontrol de la saprolegniosis con bacterias probióticas, que son eficaces en el control de vibriosis en lubina *Dicentrarchus labrax* y lactococosis en trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*





## 5.1. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Saprolegnia parasitica* por *Enterococcus gallinarum* L1, *Vagococcus fluvialis* L21 y *Lactobacillus plantarum* CLFP3

### ▪ 5.1.1. Introducción

En este capítulo se utilizan tres bacterias, *Enterococcus gallinarum*, *Vagococcus fluvialis* y *Lactobacillus plantarum* que han demostrado su eficacia, tanto *in vitro* como *in vivo*, frente a *Vibrio anguillarum* y *Lactococcus garvieae*. Estas bacterias fueron cedidas por investigadores de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y la Universidad de Zaragoza.

El objetivo es investigar si estas bacterias probióticas inhiben el crecimiento de *Saprolegnia parasitica in vitro*, si son de utilidad en el control biológico de la saprolegniosis y, en este supuesto, si el efecto inhibitorio se debe a alguna sustancia extracelular producida por estas bacterias.

### ▪ 5.1.2. Material y métodos

#### • 5.1.2.1. Bacterias y *S. parasitica*

Se emplearon tres bacterias cedidas por otros investigadores: *Enterococcus gallinarum* L1 aislada de moco intestinal de dorada (*Sparus aurata*) y *Vagococcus fluvialis* L21 obtenida del moco intestinal de lenguado (*Solea solea*); las dos bacterias son capaces de disminuir las tasas de infección por *Vibrio anguillarum* 975-1 en lubina (*Dicentrarchus labrax*) al administrarlas con el pienso durante 20 días (Sorrosa y col., 2012; 2013). También se utilizó *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* CLFP3 que procede de moco cutáneo de trucha arcoíris; esta bacteria disminuye la mortalidad de trucha arcoíris en la lactococosis por *Lactococcus garvieae* CLFPLG-1 cuando se administra en el pienso durante 36 días (Pérez-Sánchez y col., 2011a; 2011b).

Tanto en las pruebas *in vitro* como en las infecciones experimentales se utilizó *Saprolegnia parasitica* TRU 12.

#### • 5.1.2.2. Inhibición del crecimiento del micelio de *S. parasitica* en medio sólido

Se empleó la metodología descrita por Hussein y Hatai (2001). La bacteria se sembró en placas de agar BHI trazando dos líneas paralelas de 3 cm de longitud separadas entre sí por el mismo espacio, cultivando a 20 °C durante de 3, 5, y 7 días y preparando placas por duplicado para cada uno de los tres tiempos de incubación.

Tras incubar la bacteria, entre las dos estrías de siembra se depositó una porción de agar GP de 3 mm de diámetro colonizado por *S. parasitica*. Como testigo se preparó una placa de agar BHI sin la bacteria, a la que posteriormente se le añadió la porción de agar GP con *S. parasitica*. Seguidamente estas placas se incubaron nuevamente a 20 °C durante 3 días, momento en el que se realizó la medición del diámetro alcanzado por la colonia de *S. parasitica*.

- 5.1.2.3. Inhibición del crecimiento de *S. parasitica* en cañamón

La prueba se hizo según Carbajal-González y col. (2011), cada bacteria se cultivó en 3 ml de caldo BHI o MRS (cepa CLFP3) a 20 °C durante toda la noche. Después se tomó una alícuota de 500 µl que se inoculó en 25 ml en el mismo medio de cultivo y se incubó nuevamente a 20 °C en agitación (200 rpm) hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (~24 h). Cada una de las suspensiones bacterianas se centrifugó a 1000 x g durante 15 min, el pellet resultante se lavó 2 veces con suero fisiológico estéril. La concentración bacteriana se ajustó en suero fisiológico a  $2 \times 10^5$  bacterias ml<sup>-1</sup>. A partir de esta concentración bacteriana establecida como inicial se efectuaron 4 diluciones decimales. Los cañamones colonizados por *S. parasitica* TRU12 se obtuvieron como se describe en material y métodos generales. El resto del procedimiento se llevó a cabo como en el apartado 4.3.2.3., pero empleando caldo BHI en lugar de TSB.

- 5.1.2.4. Inhibición de la germinación de los quistes de *S. parasitica*

Nuevamente se empleó la metodología de Carbajal-González y col. (2011). Las bacterias se sembraron como se describe en el apartado anterior y el resto del proceso se describe nuevamente en el apartado 4.3.2.3. sustituyendo nuevamente el TSB por caldo BHI.

- 5.1.2.5. Acción fungicida de las bacterias

Se prepararon 3 placas de 24 pocillos (Falcon) con cada bacteria del mismo modo que se describe en el apartado 5.1.2.3, seguidamente los cañamones que presentaron crecimiento de *S. parasitica* se eliminaron y los que no tenían crecimiento se lavaron tres veces en frascos con 10 ml de agua destilada estéril, depositándose a continuación cada uno de los cañamones en una placa de Petri con 20 ml de agua de río filtrada estéril con estreptomycin (2 x 10<sup>2</sup> mg L<sup>-1</sup>) y penicilina (2 x 10<sup>5</sup> UI L<sup>-1</sup>). Como testigos se emplearon placas de Petri con agua de río sin los antibióticos, así como placas con agua de río, antibióticos y un cañamón con *S. parasitica* pero que no había sido puesto en contacto con la bacteria. Las placas se incubaron a 20 °C durante 20 días, examinándose diariamente para comprobar si existía crecimiento del micelio en el cañamón. Si a los 20 días no se observó crecimiento miceliano se consideró que la bacteria tenía acción fungicida. Para evitar falsos positivos por la presencia de bacterias en el agua, a las 24 h de incubación se sembraron alícuotas de

100 µl de agua en BHI, repitiéndose toda la prueba cuando hubo crecimiento bacteriano.

- 5.1.2.6. Inhibición del crecimiento miceliar y de la germinación de los quistes de *S. parasitica* utilizando los sobrenadantes bacterianos

Los sobrenadantes se obtuvieron según Lategan y col. (2006) y con ellos se efectuó la inhibición del crecimiento del micelio en cañamón y la inhibición de la germinación de los quistes como se describe en el apartado 4.3.2.3.

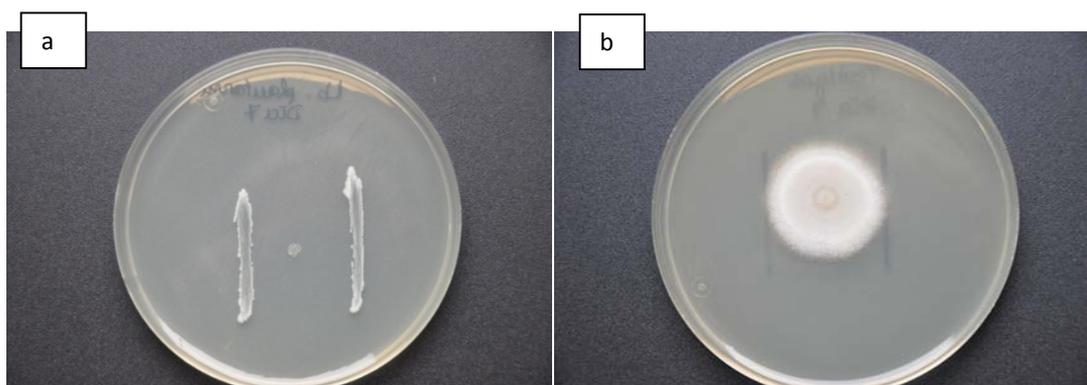
### ▪ 5.1.3. Resultados

- 5.1.3.1. Inhibición del crecimiento de *S. parasitica* en medio sólido

Las tres bacterias mostraron una mayor capacidad de inhibición del crecimiento del micelio cuando *S. parasitica* se sembró en las placas de BHI que contenían un cultivo de la bacteria de 7 días (Cuadro 13). *L. plantarum* CLFP3 fue la que mostró mayor actividad fungistática puesto que ya se observó con un cultivo de la bacteria de 3 días (Fig. 16).

**Cuadro 13.** Media (n=2) del diámetro (cm) de la colonia de *Saprolegnia parasitica* tras cultivar 3 días a 20 °C en una placa de agar BHI con un cultivo bacteriano de 3, 5 o 7 días

Tiempo de cultivo previo de la bacteria	Media de diámetro de la colonia de <i>Saprolegnia parasitica</i>			
	<i>Enterococcus gallinarum</i> L1	<i>Vagococcus fluvialis</i> L21	<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP 3	Testigo
3 días	4,25 cm	5,45 cm	0 cm	5,70 cm
5 días	3,46 cm	2,90 cm	0 cm	5,17 cm
7 días	0 cm	2,35 cm	0 cm	5,65 cm



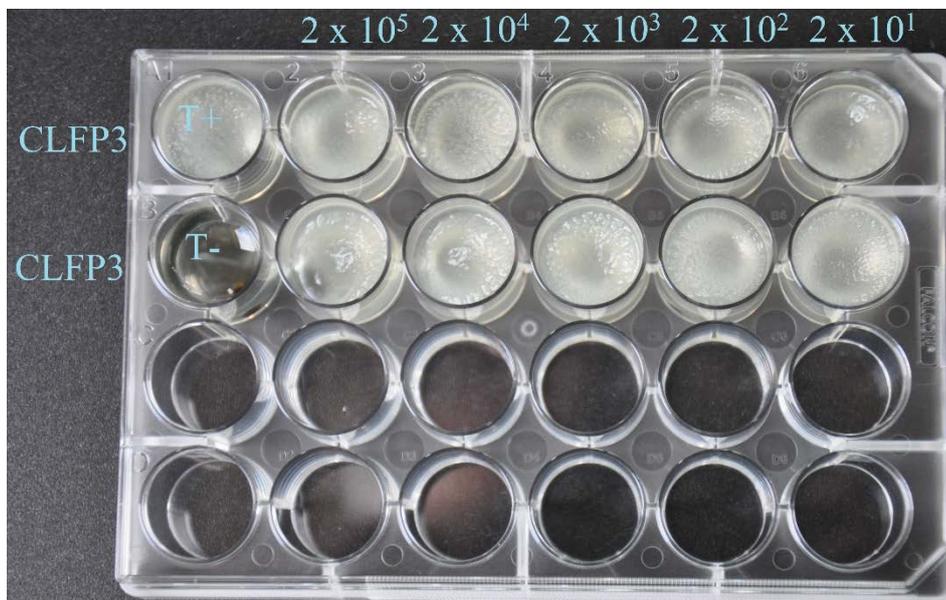
**Figura 16.** Inhibición de *Saprolegnia parasitica* por *Lactobacillus plantarum* CLFP3 en agar BHI tras cultivar 3 días a 20 °C: a) inhibición del crecimiento en una placa en la que previamente se cultivó la bacteria durante 7 días; b) testigo sin presencia de la bacteria

- 5.1.3.2. Inhibición del crecimiento de *S. parasitica* en cañamón

Tanto *E. gallinarum* L1 como *V. fluvialis* L21 inhibieron parcialmente el crecimiento del micelio de *S. parasitica* con la dilución que contenía  $2 \times 10^4$  bacterias  $\text{ml}^{-1}$  y con concentraciones superiores, por el contrario *L. plantarum* CLFP3 no inhibió el crecimiento del micelio con ninguna de las concentraciones empleadas (Fig. 17 y 18).



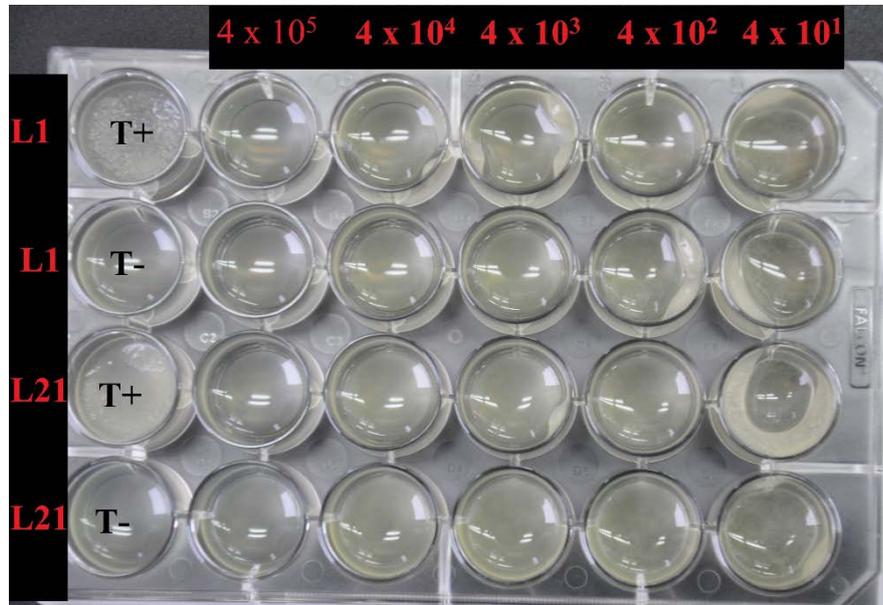
**Figura 17.** Inhibición del crecimiento micelial de *Saprolegnia parasitica* en cañamón utilizando varias diluciones de *Enterococcus gallinarum* L1 y *Vagococcus fluvialis* L21



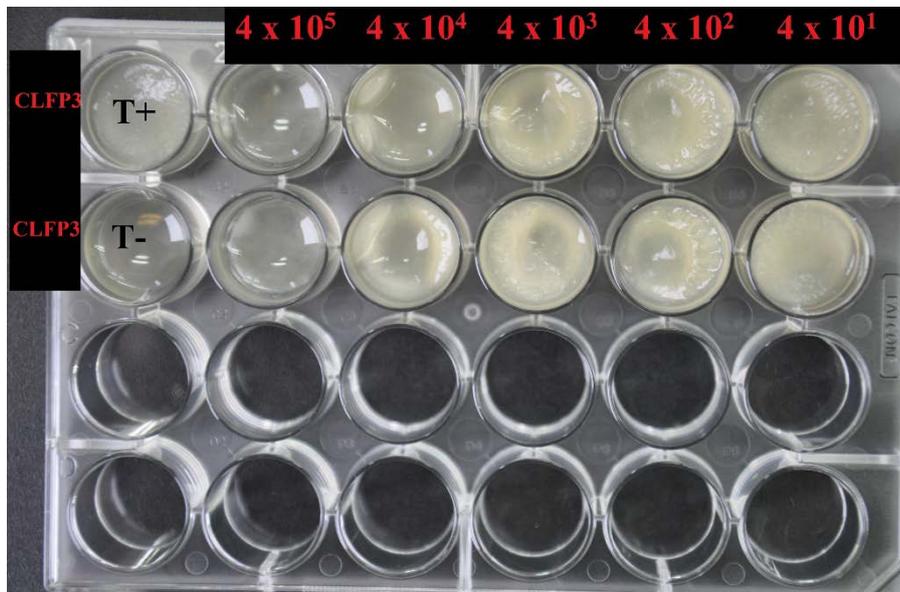
**Figura 18.** Inhibición del crecimiento micelial de *Saprolegnia parasitica* en cañamón utilizando varias diluciones de *Lactobacillus plantarum* CLFP3

- 5.1.3.3. Inhibición de la germinación de los quistes de *S. parasitica*

*E. gallinarum* L1 y *V. fluvialis* L21 inhibieron la germinación de los quistes a concentraciones superiores a  $4 \times 10^3$  bacterias  $\text{ml}^{-1}$ . En cuanto a *L. plantarum* CLFP3 solo controló la germinación con la concentración bacteriana más elevada de  $4 \times 10^5$   $\text{ml}^{-1}$  (Fig. 19 y 20).



**Figura 19.** Inhibición de la germinación de los quistes de *Saprolegnia parasitica* utilizando varias diluciones de *Enterococcus gallinarum* L1 y *Vagococcus fluvialis* L21



**Figura 20.** Inhibición de la germinación de los quistes de *Saprolegnia parasitica* utilizando varias diluciones de *Lactobacillus plantarum* CLFP3

- 5.1.3.4. Acción fungicida de las bacterias

El efecto fungicida de las diferentes concentraciones y tiempos de incubación de las tres bacterias se muestra en el Cuadro 14 (a las 24 h), Cuadro 15 (a las 48 h) y Cuadro 16 (a las 72 h). El efecto letal sobre el micelio se consiguió a menores concentraciones bacterianas a medida que se incrementaba el tiempo de incubación. *V. fluvialis* fue la bacteria que presentó un mayor efecto fungicida. En los casos en los que no hubo crecimiento en el pocillo pero sí en las placas con agua y antibióticos dicho crecimiento fue atrófico y sin desarrollo de zoosporangios.

**Cuadro 14.** Acción fungicida de diferentes concentraciones de *Enterococcus gallinarum* L1, *Vagococcus fluvialis* L21 y *Lactobacillus plantarum* CLFP3 sobre el micelio de *S. parasitica* cuando se incubaba a 20 °C durante 24 horas

Bacteria (concentración)	Efecto fungicida
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>4</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>4</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>3</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>3</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>2</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>2</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>1</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>4</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>4</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>3</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>3</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>2</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>2</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>1</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>1</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 (2 x 10 <sup>4</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 (2 x 10 <sup>4</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 (2 x 10 <sup>3</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 (2 x 10 <sup>3</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 (2 x 10 <sup>2</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 (2 x 10 <sup>2</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 (2 x 10 <sup>1</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 (2 x 10 <sup>1</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No

**Cuadro 15.** Acción fungicida de diferentes concentraciones de *Enterococcus gallinarum* L1, *Vagococcus fluvialis* L21 y *Lactobacillus plantarum* CLFP3 sobre el micelio de *S. parasitica* cuando se incubaba a 20 °C durante 48 horas

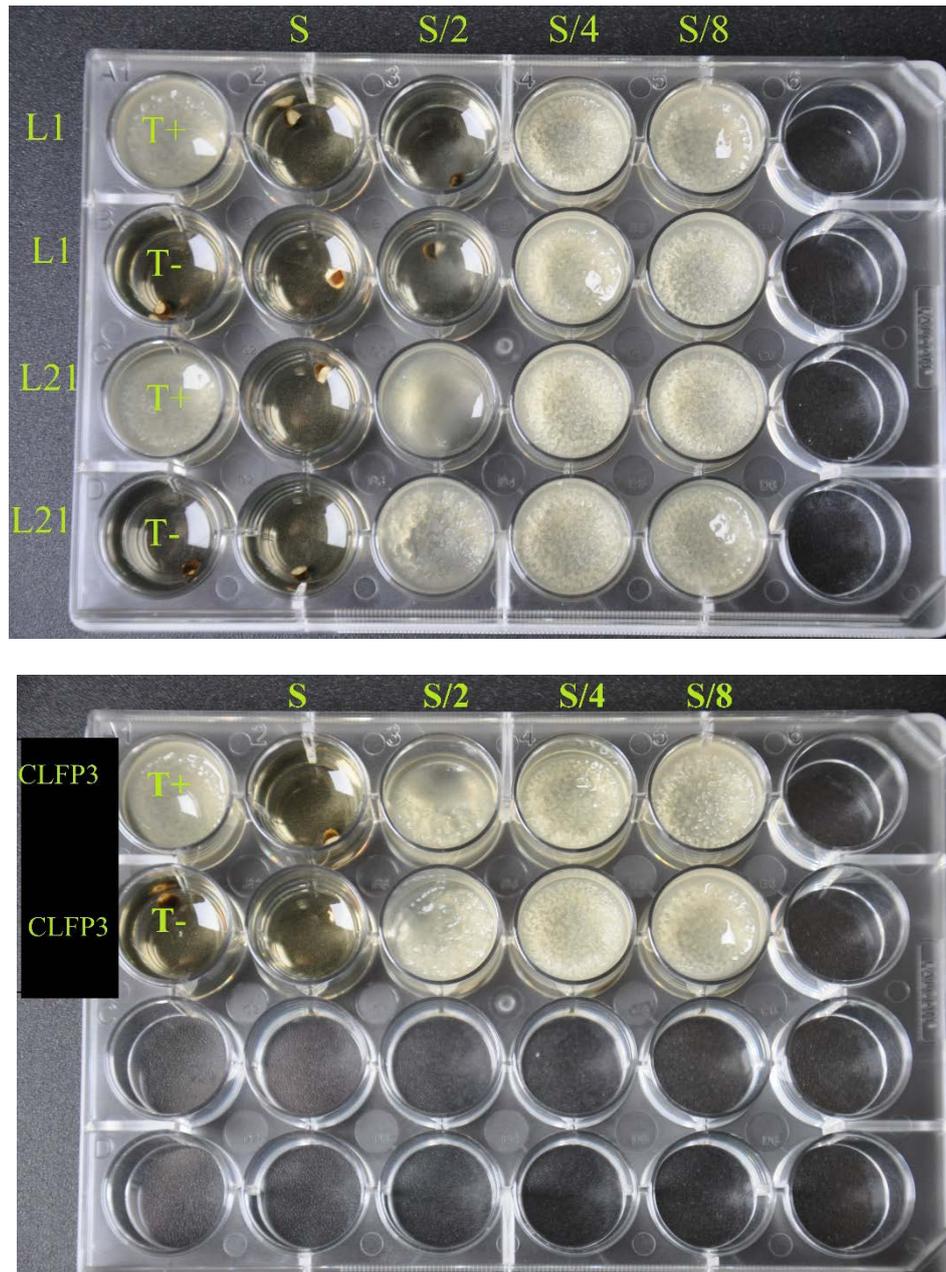
Bacteria (concentración)	Efecto fungicida
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>4</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>4</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>3</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>4</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>4</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>3</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 (2 x 10 <sup>4</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 (2 x 10 <sup>4</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 (2 x 10 <sup>3</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No

**Cuadro 16.** Acción fungicida de diferentes concentraciones de *Enterococcus gallinarum* L1, *Vagococcus fluvialis* L21 y *Lactobacillus plantarum* CLFP3 sobre el micelio de *S. parasitica* cuando se incubaba a 20 °C durante 72 horas

Bacteria (concentración)	Efecto fungicida
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>4</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>4</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1 (2 x 10 <sup>3</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	No
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>4</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>4</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21 (2 x 10 <sup>3</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 (2 x 10 <sup>5</sup> bacterias ml <sup>-1</sup> )	Sí

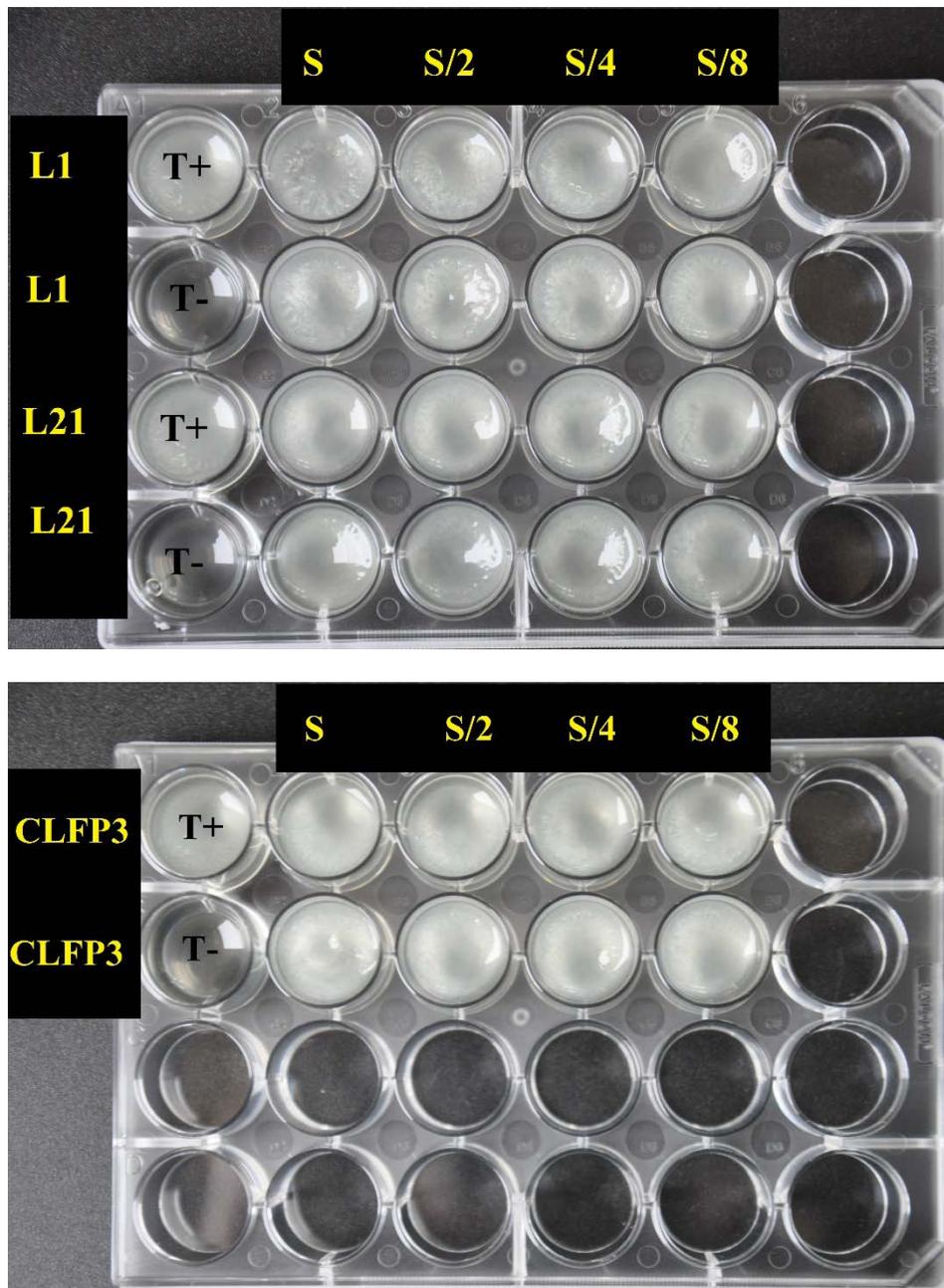
- 5.1.3.5. Inhibición del crecimiento micelial y de la germinación de los quistes de *S. parasitica* utilizando los sobrenadantes bacterianos

El sobrenadante de *E. gallinarum* y su primera dilución doble inhibieron totalmente el desarrollo micelial de *S. parasitica*, mientras el resto de las diluciones no impidieron su crecimiento. En el caso de de *V. fluvialis* y *L. plantarum* solo los sobrenadantes sin diluir impidieron el desarrollo del micelio, pero no así las diversas diluciones (Fig. 21).



**Figura 21.** Inhibición del crecimiento micelial de *Saprolegnia parasitica* en cañamón utilizando varias diluciones de los sobrenadantes del cultivo de *Enterococcus gallinarum* L1, *Vagococcus fluvialis* L21 y *Lactobacillus plantarum* CLFP3

Respecto a la inhibición de la germinación de los quistes de *S. parasitica*, ninguno de los sobrenadantes de las tres bacterias fue inhibitorio (Fig. 22).



**Figura 22.** Inhibición de la germinación de los quistes de *Saprolegnia parasitica* utilizando varias diluciones de los sobrenadantes del cultivo *Enterococcus gallinarum* L1, *Vagococcus fluvialis* L21 y *Lactobacillus plantarum* CLFP3

#### ▪ 5.1.4. Discusión

Las tres bacterias inhibieron el crecimiento de *S. parasitica* en medio sólido siendo la inhibición más acusada en el caso de *L. plantarum* CLFP3, ya que apareció desde los tres días de incubación de la bacteria. A su vez la mayor inhibición de *E. gallinarum* y *V. fluvialis* fue con los cultivos bacterianos que ya tenían previamente 7 días de

crecimiento, por lo que esta inhibición podría deberse a la difusión en el medio de alguna sustancia bacteriana con capacidad antifúngica o a que la bacteria utiliza nutrientes esenciales para el desarrollo de *S. parasitica*. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Hussein y Hatai (2001), aunque ellos encontraron diferencias según el medio de cultivo empleado, cuando utilizaron agar BHI la inhibición fue mayor cuando emplearon tiempos mayores de incubación.

Respecto a la inhibición de *S. parasitica* en cultivo líquido con cañamón, *E. gallinarum* y *V. fluvialis*, que proceden de peces marinos, evitaron el crecimiento miceliar, mientras que *L. plantarum* fue incapaz de controlarlo. Sin embargo las tres bacterias inhibieron la germinación de los quistes, aunque *L. plantarum* precisó de concentraciones mayores. Estos datos coinciden con los obtenidos por Bly y col. (1997) en los que pequeñas cantidades de diferentes bacterias del género *Pseudomonas* impidieron la germinación de los quistes. La inhibición de la germinación de los quistes *in vitro* podría indicar que estas bacterias dificultarían la germinación en la superficie externa del pez, ayudando por tanto a controlar la infección por *S. parasitica*.

L1 y L21 necesitaron concentraciones menores para evitar la germinación de los quistes ( $2 \times 10^3$  bacterias  $\text{ml}^{-1}$ ) que para inhibir el crecimiento del micelio en el cañamón ( $2 \times 10^4$  bacterias  $\text{ml}^{-1}$ ). Estos datos concuerdan con los obtenidos por Carbajal-González (2013) que en su trabajo sugiere que la necesidad de concentraciones de bacterias menores para inhibir los quistes sería debido a que en el cañamón ya preexiste un talo de hifas, mientras que los quistes tienen que germinar y formar el micelio.

La obtención de una mayor inhibición cuando se emplea la inhibición en medio líquido indicaría que la acción de la bacteria se debería a la producción de sustancias extracelulares, mientras que cuando esta inhibición es más acusada en medio sólido, como ocurre con *L. plantarum*, esta se debería a otros mecanismos como la competición por los nutrientes del medio.

*E. gallinarum* y *V. fluvialis* fueron fungicidas para *S. parasitica* en los cultivos de 24 horas y a medida que aumentó el tiempo de incubación a 48-72 horas también fue fungicida *L. plantarum*. Este efecto fungicida es de interés puesto que las tres bacterias serían capaces de inactivar a *S. parasitica* y ayudar al control de la infección actuado no solo como fungistáticos.

Ninguno de los sobrenadantes de las tres bacterias inhibió la germinación de los quistes de *S. parasitica*, coincidiendo con los datos de Bly y col. (2011), pero en nuestro caso los sobrenadantes si detuvieron el crecimiento del micelio preexistente en el cañamón. La mayor inhibición cuando se emplea *E. gallinarum* podría deberse a que esta bacteria produce ácido láctico y acético, así como pequeñas cantidades de etanol (Sorroza, 2012).

## 5.2. Adhesión de *Enterococcus gallinarum* L1, *Vagococcus fluvialis* L21 y *Lactobacillus plantarum* CLFP3 al moco cutáneo de trucha común e inhibición de la adhesión de los quistes de *Saprolegnia parasitica*

### ▪ 5.2.1. Introducción

Uno de los mecanismos de acción descrito en los probióticos es la exclusión competitiva de los microorganismos patógenos en el hospedador (Vine y col., 2004b; Chabrillón y col., 2005; Bálcazar, 2007). En consecuencia se planteó el comprobar si las bacterias utilizadas en este estudio se adherían al moco cutáneo de trucha, y si ello dificultaba la adhesión de los quistes de *S. parasitica* en condiciones de exclusión, competición y desplazamiento.

### ▪ 5.2.2. Material y métodos

#### • 5.2.2.1. Bacterias y quistes de *S. parasitica*

Se emplearon las tres bacterias descritas en el apartado 5.1.2.1. *E. gallinarum* y *V. fluvialis* se incubaron en caldo BHI y *L. plantarum* en caldo MRS, todas a 20 °C durante 24 h en un agitador orbital Khuner® a 120 rpm. Los cultivos se centrifugaron a 10 500 x g durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en suero fisiológico estéril. Seguidamente se ajustó la concentración bacteriana a 10<sup>9</sup> bacterias ml<sup>-1</sup> y tomando esta concentración como la inicial se efectuaron 3 diluciones 1:10 en suero fisiológico estéril. Para las pruebas de adhesión de las bacterias al moco cutáneo, estas se tiñeron con el colorante fluorescente para ácidos nucleicos Syto 9® (Invitrogen™) según Van der Marel y col. (2008) y Carbajal-González y col. (2013), empleando 1 µl de colorante por 10<sup>9</sup> bacterias y centrifugando posteriormente para eliminar los restos de colorante a 10 500 x g, 10 min; y añadiendo nuevamente 1 ml de suero fisiológico para resuspenderlas.

Para las pruebas de competición, exclusión y desplazamiento se emplearon quistes de *S. parasitica* TRU12, ajustando la concentración de zoosporas a 10<sup>5</sup> ml<sup>-1</sup> tal como se describe en el apartado 3.1. Posteriormente los quistes se tiñeron con Syto 9® (Invitrogen™) a una concentración de 1 µl de colorante por cada 10<sup>5</sup> quistes ml<sup>-1</sup>, seguidamente la suspensión de quistes teñidos se centrifugó para eliminar los restos de colorante (18 500 x g, 20 min) y se resuspendieron en 1 ml de suero fisiológico estéril (Carbajal-González y col., 2013) (Fig. 23).



**Figura 23.** Quistes de *Saprolegnia parasitica* teñidos con Syto 9<sup>®</sup>, recuento en cámara de Neubauer (100x)

- 5.2.2.2. Obtención del moco cutáneo y tapizado de las placas

El moco se recolectó de ejemplares macho y hembra de trucha común (*Salmo trutta*) de  $196,7 \pm 39,5$  g procedentes del Centro piscícola de Vegas del Condado (Junta de Castilla y León), siguiendo la misma metodología ya descrita en el apartado 4.2.2.1.3.

Se tapizaron placas de poliestireno de 96 pocillos de color negro (Costar<sup>®</sup>). Para las pruebas de adhesión de las bacterias al moco se prepararon pocillos con 25  $\mu$ l de moco cutáneo de trucha macho, de trucha hembra, moco gástrico de cerdo (Mucin from porcine stomach, Type II, Sigma) y albúmina sérica bovina (Sigma), todos ellos con una concentración de proteínas de 0,05 mg ml<sup>-1</sup>. Posteriormente a todos los pocillos se añadieron 75  $\mu$ l de tampón de tapizado (16,8 g L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>, 21,2 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,6), incubando las placas durante una noche a 4 °C. Seguidamente las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 al 0,005 %. Para las pruebas de exclusión, competición y desplazamiento los pocillos se tapizaron solo con moco cutáneo de trucha común macho.

- 5.2.2.3. Adhesión de las bacterias al moco cutáneo

En una placa tapizada como se describe en el apartado anterior se añadió a cada pocillo 25  $\mu$ l de la suspensión bacteriana a una concentración de  $2 \times 10^9$  bacterias ml<sup>-1</sup> teñidas con 1  $\mu$ l de Syto 9<sup>®</sup>, seguidamente se centrifugó a 163 x g para forzar que se situen en el fondo del pocillo. Las placas se incubaron selladas a una temperatura de 20 °C en oscuridad durante 30 min. Transcurrido ese tiempo se efectuó una primera lectura de la fluorescencia en un espectofotómetro (Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader, Bio-Tek<sup>®</sup>) a 485 nm de excitación y 535 nm de emisión. Posteriormente los pocillos se lavaron con suero fisiológico para eliminar las bacterias no adheridas y se eliminó la humedad centrifugando las placas a 163 x g boca abajo. Se hizo una segunda lectura de fluorescencia tras añadir 50  $\mu$ l de suero fisiológico a los pocillos y se calculó el porcentaje de adhesión de las bacterias a cada tipo de moco considerando la fluorescencia emitida por la lectura inicial como el 100 % de adhesión de las bacterias.

- 5.2.2.4. Exclusión de *S. parasitica*

Se empleó una placa de poliestireno de 96 pocillos tapizada con moco cutáneo de trucha común macho como se describe en el apartado 5.2.2.2. A cada pocillo se añadieron 25 µl de la dilución bacteriana. La placa se centrifugó a 163 x g, 12 s para forzar el desplazamiento de las bacterias al fondo del pocillo y posteriormente se incubó a 20 °C, 30 min en oscuridad. Tras la incubación se lavaron con suero fisiológico estéril para eliminar las bacterias no adheridas y se añadieron 25 µl de una suspensión de quistes de *S. parasitica* teñidos con Syto 9<sup>®</sup>. La placa se incubó nuevamente durante 30 min a 20 °C en oscuridad. Se lavó la placa con suero fisiológico estéril para eliminar los quistes no unidos al moco cutáneo y se añadieron 50 µl de suero fisiológico estéril a todos los pocillos. Se prepararon pocillos testigos en los que se sustituyó la suspensión bacteriana por suero fisiológico estéril y blancos a los que solo se añadió suero fisiológico. La fluorescencia emitida se leyó con un espectofotómetro a 485 nm de excitación y 535 nm de emisión.

- 5.2.2.5. Desplazamiento de *S. parasitica*

Se empleó la misma metodología que para la exclusión, pero primero se añadieron 25 µl de quistes teñidos y tras incubar y lavar se añadieron los 25 µl de la bacteria sin teñir. Las placas se incubaron nuevamente, se lavaron y se realizó la lectura de la fluorescencia.

- 5.2.2.6. Competición con *S. parasitica*

Se procedió como se describe en la prueba de desplazamiento pero con la diferencia de que los 25 µl de quistes teñidos y los 25 µl de bacterias sin teñir se añadieron simultáneamente, incubando a continuación a 20 °C en oscuridad durante 60 min, seguido del lavado y lectura ya descritos.

- 5.2.2.7. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes. Para todas las pruebas se utilizó el estadístico *t* de Student para determinar si las diferencias en la adhesión de las bacterias o los quistes eran estadísticamente significativas comparadas con los testigos. Se consideró que los valores  $p \leq 0,05$  eran estadísticamente significativos. Todos los cálculos se realizaron con el programa SPSS versión 24.

- 5.2.3. Resultados

Los resultados de la adhesión de las tres bacterias al moco cutáneo de trucha común se muestran en el Cuadro 17. La adhesión de L1, L21 y CLFP3 al moco de trucha macho en general fue baja, comprendida entre el 14,60 % de *V. fluvialis* y el 7,54 %

de *E. gallinarum*, pero fue mayor que al moco de trucha hembra, y generalmente en ambos mocos mayor que la adhesión de las bacterias a la albúmina sérica bovina y al moco gástrico de cerdo. No existieron diferencias significativas de adhesión a los sustratos probados con ninguna de las bacterias empleadas ( $p \leq 0,05$ ). Puesto que todas las bacterias presentaron una mayor adhesión al moco cutáneo de trucha común macho, éste se empleó en las pruebas de competición, desplazamiento y exclusión de los quistes de *S. parasitica*.

**Cuadro 17.** Porcentaje de adhesión (media  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ ) de *Enterococcus gallinarum* L1, *Vagococcus fluvialis* L21, y *Lactobacillus plantarum* CLFP3 al moco cutáneo de trucha común macho (MCM), moco de trucha común hembra (MCH), albúmina sérica bovina (ASB) y moco gástrico de cerdo (MGC)

Bacteria	% de adhesión bacteriana			
	MCM	MCH	ASB	MGC
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1	7,54 $\pm$ 4,77	4,39 $\pm$ 2,97	4,57 $\pm$ 3,48	3,28 $\pm$ 3,48
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21	14,60 $\pm$ 5,48	13,07 $\pm$ 5,94	7,87 $\pm$ 4,56	10,48 $\pm$ 3,89
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3	9,92 $\pm$ 7,59	9,64 $\pm$ 8,10	4,13 $\pm$ 1,31	4,20 $\pm$ 1,45

Los resultados de la exclusión, competición y desplazamiento de los quistes de *S. parasitica* se muestran en el Cuadro 18. En general las tres bacterias necesitaron concentraciones más bajas para reducir la adhesión de los quistes de *S. parasitica* en la prueba de competición; por el contrario para el desplazamiento de los quistes se precisaron concentraciones bacterianas más altas. CLFP3 fue la bacteria que mejor redujo la adhesión de los quistes de *S. parasitica* en las tres pruebas a pesar de presentar menores porcentajes de adhesión al moco que L1 y L21.

**Cuadro 18.** Porcentaje de reducción de la adhesión (media  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ ) de los quistes de *Saprolegnia parasitica* al moco cutáneo de trucha común macho en presencia de diferentes concentraciones bacterianas de *Enterococcus gallinarum* L1, *Vagococcus fluvialis* L21, y *Lactobacillus plantarum* CLFP3 en condiciones de exclusión, desplazamiento y competición

Bacteria	Número de células	% de reducción de la adhesión de los quistes de <i>Saprolegnia parasitica</i>		
		Exclusión	Desplazamiento	Competición
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1	2,5 x 10 <sup>7</sup>	28,55 $\pm$ 0*	26,68 $\pm$ 2,92	65,03 $\pm$ 1,28
	2,5 x 10 <sup>6</sup>	19,05 $\pm$ 6,73	24,93 $\pm$ 5,97*	27,08 $\pm$ 3,05
	2,5 x 10 <sup>5</sup>	7,50 $\pm$ 0	18,40 $\pm$ 14,77	6,33 $\pm$ 1,39
	2,5 x 10 <sup>4</sup>	6,87 $\pm$ 1,89	0	6,26 $\pm$ 1,22*
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21	2,5 x 10 <sup>7</sup>	83,11 $\pm$ 1,31	93,24 $\pm$ 18,73*	73,86 $\pm$ 5,55
	2,5 x 10 <sup>6</sup>	62,81 $\pm$ 3,72*	25,09 $\pm$ 9,21	40,03 $\pm$ 1,76*
	2,5 x 10 <sup>5</sup>	55,45 $\pm$ 35,84	13,59 $\pm$ 9,88	7,39 $\pm$ 3,14
	2,5 x 10 <sup>4</sup>	17,67 $\pm$ 22,71	6,45 $\pm$ 4,13	6,49 $\pm$ 4,15
<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3	2,5 x 10 <sup>7</sup>	87,50 $\pm$ 0	33,32 $\pm$ 8,14*	33,33 $\pm$ 2,09
	2,5 x 10 <sup>6</sup>	76,01 $\pm$ 6,48	22,30 $\pm$ 8,37	7,78 $\pm$ 1,45
	2,5 x 10 <sup>5</sup>	70,98 $\pm$ 8,39*	11,05 $\pm$ 8,33	5,44 $\pm$ 1,44
	2,5 x 10 <sup>4</sup>	46,49 $\pm$ 17,63	0	7,29 $\pm$ 0,68*

\*Indica el porcentaje de reducción de la adhesión de los quistes alcanzado con el menor número de bacterias que es estadísticamente significativo comparando con el testigo

#### ▪ 5.2.4. Discusión

Sorroza (2012) empleó dos métodos para determinar la adhesión de L1 y L21 al moco intestinal de dorada, lubina, corvina y lenguado, uno basado en marcadores radiactivos y otro tñiendo las bacterias con Syto 9<sup>®</sup> (el empleado por nosotros). Cuando empleó el método basado en marcadores radiactivos obtuvo mayores porcentajes de adhesión de L21 que de L1, coincidiendo con nuestros resultados para la adhesión de estas bacterias al moco cutáneo de trucha común. Por el contrario cuando empleó la misma técnica empleada por nosotros con Syto 9<sup>®</sup> obtuvo un porcentaje de adhesión de L1 superior al de L21 al moco intestinal de peces marinos.

Comparando la adhesión de L1 y L21 al moco intestinal de diversos peces marinos y al cutáneo de trucha común, ambas bacterias presentaron un porcentaje de adhesión mayor al moco intestinal. Estos resultados coinciden con los de Bálcazar y col. (2008) que empleando tres bacterias de la microbiota intestinal de trucha arcoíris observó una mayor adhesión al moco intestinal que al cutáneo.

Esta mayor adhesión de las bacterias L1 y L21 al moco intestinal puede estar relacionado con el origen de estas bacterias, ya que fueron aisladas de moco intestinal, sin embargo CLFP3, que originalmente fue aislada de moco cutáneo (Pérez-Sánchez y col., 2011) presentó porcentajes de adhesión al moco cutáneo menores que L21.

Chabrillón y col. (2005) indicaron que no existiría adhesión específica de las bacterias a un hospedador concreto, si no que la capacidad de adhesión dependería más de la cepa que del hospedador. Esto concordaría con los datos obtenidos para L1, L21 y CLFP3, ya que no existieron diferencias significativas en la adhesión a los distintos sustratos empleados, aunque fuera mayor la adhesión al moco cutáneo.

En general todas las bacterias necesitaron concentraciones bacterianas mayores para el desplazamiento de los quistes de *S. parasitica*, lo que coincide con los resultados de Carbajal-González y col. (2013), que a su vez indica que la mayor necesidad de bacterias para el desplazamiento se debería a una alta adhesión de los quistes de *S. parasitica* al moco, lo que dificultaría su posterior eliminación por las bacterias. Las concentraciones más bajas de bacterias para reducir significativamente la unión de los quistes de *S. parasitica* se dio en condiciones de competición.

Las tres bacterias redujeron la adhesión de los quistes de *S. parasitica* y a su vez inhibieron el crecimiento de *S. parasitica in vitro*, lo que lleva a pensar que L1, L21 y CLFP3 podrían ser buenas candidatas para su utilización como probióticos en el biocontrol de la saprolegniosis en trucha.

### 5.3. Comprobación de la ausencia de patogenicidad de *Enterococcus gallinarum* L1 y *Vagococcus fluvialis* L21 para la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*

#### ▪ 5.3.1. Introducción

Para el empleo de un microorganismo en el biocontrol de una enfermedad es imprescindible que ese microorganismo sea inocuo para la especie animal en la que se utiliza (Salminen y col., 1999; Verschuere y col., 2000; Wang y col., 2008) Por ello Sorroza y col. (2012; 2013) describieron que *E. gallinarum* L1 y *V. fluvialis* L21 son apatógenas para la lubina, pero no las probaron con trucha arcoíris, por lo que se procedió a comprobar la inocuidad de L1 y L21 para la trucha. En el caso de *L. plantarum* no se comprobó su inocuidad puesto que se ha comprobado que es probiótica para la trucha arcoíris (Pérez-Sánchez y col., 2011b).

#### ▪ 5.3.2. Material y métodos

##### • 5.3.2.1. Peces y tanques

Se emplearon juveniles de trucha arcoíris de  $37,24 \pm 7,56$  g de peso procedentes de la misma piscifactoría y en las mismas condiciones ya citadas en el apartado 4.1.2.3.

##### • 5.3.2.2. Bacterias e inoculación

Los inóculos se preparon a partir de suspensiones bacterianas de *E. gallinarum* L1 y *V. fluvialis* L21 obtenidas tal como se describe en el apartado 5.1.2.3. ajustando su concentración a  $10^7$  bacterias  $\text{ml}^{-1}$  mediante recuento en cámara de Neubauer.

Se dispusieron dos tanques experimentales de 40 L con 20 truchas, uno para la inoculación de los peces por vía intramuscular y otro para la inoculación intraperitoneal.

Los peces se anestesiaron mediante inmersión en agua con 50 ppm de MS-222 (Sigma®) y cada uno de ellos fue inoculado con 0,1 ml de la suspensión bacteriana ( $10^7$  bacterias  $\text{ml}^{-1}$ ), por vía intramuscular o intraperitoneal. Como testigos se emplearon tanques con 20 peces a los que en vez de la bacteria se les inyectó 0,1 ml de PBS estéril.

Durante los 10 días posteriores a la inoculación se efectuó el seguimiento de los peces para detectar la presencia de signos de enfermedad o lesiones. Transcurrido ese tiempo los peces se sacrificaron por inmersión en agua con 100 ppm de MSS-222 y se llevó a cabo la necropsia de todos ellos. También se realizaron siembras en agar BHI de hígado, riñón y bazo de todos los peces, así como de la zona de inoculación en aquellos que fueron inyectados por vía intramuscular. Las placas de BHI se incubaron a 20 °C durante 3 días y se procedió a la identificación de las colonias resultantes por pruebas fenotípicas básicas (morfología, tinción Gram y pruebas

bioquímicas básicas como la catalasa y oxidasa) para determinar si la bacteria inyectada estaba presente en los órganos internos o la zona de inoculación.

#### ▪ 5.3.3. Resultados

Tanto *Enterococcus gallinarum* L1 como *Vagococcus fluvialis* L21 fueron inocuas para la trucha arcoíris. En ninguno de los peces inoculados se observaron signos de enfermedad, ni lesiones, ni hubo bajas durante los 10 días que los peces se mantuvieron en observación.

En el estudio microbiológico de los órganos internos solo se reaislaron algunas colonias de *E. gallinarum* en dos peces, en el riñón de uno inoculado por vía intramuscular y en el bazo de otro inyectado por vía intraperitoneal.

#### ▪ 5.3.4. Discusión

Tal como se ha comentado anteriormente uno de los criterios ineludibles para la selección de bacterias probióticas es que no ocasionen daños en la especie de pez en la cual se van a emplear, no obstante Sharifuzzaman y Austin (2009) afirman que esta propiedad no suele ser investigada cuando se comienza la selección de una nueva cepa probiótica.

Según Sorroza (2012) *Enterococcus gallinarum* L1 y *Vagococcus fluvialis* L21 producen hemólisis parcial en agar sangre pero ambas fueron apatógenas en lubina (*Dicentrarchus labrax*) cuando se inocularon intraperitonealmente. En nuestro caso estas dos bacterias también fueron inocuas por las vías intramuscular e intraperitoneal en trucha arcoíris.

Dentro del género *Vagococcus* existe una especie *Vagococcus salmoninarum* capaz de causar mortalidades de hasta el 55 % en trucha arcoíris (Austin y Austin, 2007). A su vez en un estudio sobre microbiota de peces de agua dulce (trucha común, trucha arcoíris y lucio) realizado en nuestro entorno (provincia de León) se indica que *V. fluvialis* forma parte de dicha microbiota (González y col., 2000). Respecto al género *Enterococcus* se describió como patógena para la trucha arcoíris la especie *Enterococcus seriolicida*, pero estudios posteriores determinaron que estos aislados patógenos deben incluirse dentro de la especie *Lactococcus garvieae* (Eldar y col., 1996).

La inocuidad de L1 y L21 unida a la ya conocida de CLFP3, nos permite emplearlas para comprobar si son efectivas en la prevención y control de la saprolegniosis en trucha arcoíris.

## 5.4. Biocontrol de la saprolegniosis en trucha arcoíris añadiendo *Enterococcus gallinarum* L1, *Vagococcus fluvialis* L21 y *Lactobacillus plantarum* CLFP3 al agua o al pienso

### ▪ 5.4.1. Introducción

El objetivo es comprobar si las bacterias probióticas *E. gallinarum* L1, *V. fluvialis* L21 y *L. plantarum* CLFP3 empleadas para el control de otras enfermedades de peces (Sorroza y col. 2012 y 2013; Pérez-Sánchez y col., 2011) pueden también ser útiles para el control de la saprolegniosis comparándolas a su vez con los buenos resultados obtenidos con los aislados de *Pseudomonas fluorescens* descritos en el capítulo 4.

### ▪ 5.4.2. Material y métodos.

#### • 5.4.2.1. Bacterias

Se utilizaron las bacterias *Enterococcus gallinarum* L1, *Vagococcus fluvialis* L21 y *Lactobacillus plantarum* CLFP3 (Cuadro 19).

**Cuadro 19.** Bacterias probióticas utilizadas en las pruebas para el biocontrol de la saprolegniosis en trucha arcoíris indicando su origen y actividad probiótica

Bacteria	Origen	Efectividad probiótica demostrada	Autores
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1	Moco intestinal de lenguado	Vibriosis ( <i>V. angillarum</i> ) en lubina	Sorroza y col., 2013
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21	Moco intestinal de dorada	Vibriosis ( <i>V. angillarum</i> ) en lubina	Sorroza y col., 2012
<i>Lactobacillus plantarum plantarum</i> CLFP3	Moco cutáneo de trucha arcoíris	Lactococosis ( <i>L. garvieae</i> ) en trucha arcoíris	Pérez-Sánchez y col., 2011a; 2011b

Las suspensiones bacterianas se obtuvieron tal como se describe en el apartado 5.1.2.3.

#### • 5.4.2.2. Desafío experimental añadiendo el probiótico en el agua

Se emplearon grupos de 20 ejemplares juveniles de trucha arcoíris de  $38,79 \pm 10,00$  g, administrando de forma individual cada una de las bacterias e infectando los peces con *S. parasitica* mediante el procedimiento descrito en el apartado 4.1.2.

- 5.4.2.3. Desafío experimental añadiendo el probiótico en el pienso

Se emplearon grupos de 20 juveniles de trucha arcoíris de  $29,29 \pm 10,33$  g suministrando las bacterias y realizando la infección experimental con *S. parasitica* del mismo modo que en el apartado 4.2.2.2.

- 5.4.2.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el test de Fisher de dos vías para comprobar si la protección frente a la infección era significativa respecto a la de los peces testigo utilizando el programa Epi Info 7<sup>TM</sup> (CDC).

#### ▪ 5.4.3. Resultados

Ninguna de las tres bacterias, *Enterococcus gallinarum* L1, *Vagococcus fluvialis* L21 y *Lactobacillus plantarum* CLFP3, evitó la infección por *S. parasitica* a través del agua o del pienso en trucha arcoíris (Cuadro 20).

**Cuadro 20.** Porcentaje de peces no infectados frente a la saprolegniosis en trucha arcoíris tratada con L1, L21 y CLFP3 en el agua y en el pienso, respecto a los testigos

Bacteria	% de peces no infectados	
	Bacteria añadida en el agua	Bacteria añadida en el pienso
<i>Enterococcus gallinarum</i> L1	0 %	0 %
<i>Vagococcus fluvialis</i> L21	0 %	0 %
<i>Lactobacillus platarum plantarum</i> CLFP3	0 %	0 %

#### ▪ 5.4.4 Discusión

Si bien en conjunto L1, L21 y CLFP3 dieron resultados aceptables de inhibición *in vitro* ante *Saprolegnia parasitica*, las pruebas de biocontrol de la saprolegniosis experimental en trucha arcoíris no resultaron eficaces para prevenir ni controlar la enfermedad a través del agua o el pienso. Gram y col. (2001) señalaron que no siempre los resultados obtenidos *in vitro* por un microorganismo frente a un patógeno pueden predecir los efectos que aquél va a producir cuando se emplee *in vivo*.

La eficacia de un probiótico frente a una enfermedad en un determinado hospedador, no asegura que este probiótico sea también eficaz en otro hospedador y frente a otro agente patógeno. Gram y col. (1999) añadiendo *Pseudomonas fluorescens* AH2 al agua de los tanques, frente a *Vibrio anguillarum*, disminuyeron la mortalidad en trucha arcoíris, pero cuando emplearon el mismo probiótico en salmón (*Salmo salar*)

frente a la furunculosis por *Aeromonas salmonicida* comprobaron que no siempre el mismo probiótico es eficaz frente a patógenos diferentes (Gram y col. 2001).

A diferencia de nosotros, Nurhajati y col. (2012) consiguieron prevenir la infección por *S. parasitica* en *Pangasius hypophthalmus* añadiendo diferentes concentraciones de *Lactobacillus plantarum* FNCC 226 al agua, aunque el método empleado para provocar la infección experimental difiere del nuestro, ya que estos autores realizan una incisión de 0,5 cm en el tronco del pez en vez del tratamiento “ami-momi”.

Las tres bacterias también resultaron ineficaces por vía oral al administrarlas con el pienso. Desconocemos si puede haber influido el que con L1 y L21 se empleó una dosis menor en el pienso ( $10^8$  UFC  $g^{-1}$ ) que la empleada por Sorroza y col. (2012; 2013) para controlar la vibriosis en lubina ( $10^9$  UFC  $g^{-1}$ ). Algunos autores consideran que existe una relación entre la dosis de probiótico empleada y su efecto (Nikoskelanien y col., 2001). Por el contrario en el caso de CLFP3 la dosis se aumentó dos unidades logarítmicas ( $10^8$  UFC  $g^{-1}$ ) por encima de la empleada por Pérez-Sánchez y col. (2011) en el trabajo que evidenció su eficacia frente a *Lactococcus garvieae* en trucha arcoíris ( $10^6$  UFC  $g^{-1}$ ). Nayak (2010) indica que las dosis más empleadas en la administración de probióticos en el pienso en acuicultura oscilan entre  $10^6$  y  $10^{10}$  UFC  $g^{-1}$ , pero que el óptimo de cada probiótico debe establecerse en función del hospedador. En la literatura se encuentran diferencias en cuanto a los resultados de diferentes dosis viéndose en algunos casos aumentada la protección frente a patógenos o un aumento de la respuesta inmunitaria a mayor dosis, pero en otros casos un aumento de la dosis de probiótico puede provocar un descenso en la protección frente a una enfermedad, como describen Son y col. (2009).

El periodo de administración de L1, L21 fue globalmente mayor (24 días) que el empleado por Sorroza y col. (2012 y 2013), no así en el caso de Pérez-Sánchez y col. (2011b) que fue de 36 días, pero en ambos casos nuestro desafío se llevó a cabo tras 14 días de administración de pienso, en lugar de los 20 o 21 días de administración previos a los desafíos con *Vibrio anguillarum* y *Lactococcus garvieae* respectivamente. Algunos autores han demostrado que la administración del probiótico durante periodos de tiempo mayores incrementan la supervivencia de los peces, como en el caso de Sharifuzzaman y Austin (2009) que vieron incrementada la supervivencia de trucha arcoíris un 6 % al administrar *Kocuria* SM1 durante 2 semanas más. Aunque en su caso la administración durante dos semanas sí incrementó la supervivencia de los peces frente a *V. anguillarum*, mientras que en nuestro caso no se observó ningún descenso en el número de peces infectados.

# CONCLUSIONES



Mosaico Romano, Museo de Trípoli (cedida por Xavier Sierra autor del blog Un dermatólogo en el museo <http://xsierrav.blogspot.com.es>)



PRIMERA. Las bacterias procedentes de moco cutáneo de trucha común y trucha arcoíris, *Pseudomonas fluorescens* LE89 y *Pseudomonas fluorescens* LE141, podrían emplearse para el biocontrol de la saprolegniosis por *Saprolegnia parasitica* en trucha arcoíris añadiéndolas al agua.

SEGUNDA. Tanto *Pseudomonas fluorescens* LE89 como *Pseudomonas fluorescens* LE141 no parecen ser efectivas frente a la saprolegniosis cuando se administran a través del pienso en trucha arcoíris.

TERCERA. El modo de acción de *Pseudomonas fluorescens* LE89 y *Pseudomonas fluorescens* LE141 cuando se añaden al agua estaría relacionado con la exclusión competitiva de *S. parasitica* mediante la competición por nutrientes esenciales, mediante la producción de sideróforos, y la producción de sustancias de naturaleza proteica en el caso de LE141.

CUARTA. *Enterococcus gallinarum* L1, *Vagococcus fluvialis* L21 y *Lactobacillus plantarum* CLFP3 no parecen ser efectivas en el biocontrol de la saprolegniosis.

QUINTA. *Enterococcus gallinarum* L1 y *Vagococcus fluvialis* L21 no son patógenos para la trucha arcoíris y por lo tanto podrían emplearse para el biocontrol de enfermedades en *Oncorhynchus mykiss*.

SEXTA. La eficacia de una bacteria probiótica frente a un determinado agente patógeno y hospedador, no necesariamente es extrapolable frente a agentes patógenos y hospedadores diferentes, aunque los resultados previos *in vitro* sean esperanzadores.



# ANEXOS



Mosaico romano, Basilica di Santa Maria Assunta en Aquileia (cedida por el Dr. José Miguel Aller Gancedo)



# Anexo I: Abreviaturas y símbolos

ANOVA: análisis de varianza

ASB: albúmina sérica bovina

Aprox.: aproximadamente

BHI: brain hearth infusion (infusión cerebro corazón)

Ca: calcio

CAS: chromo-azurol-s

cm: centímetro

col.: colaboradores

Cu: cobre

DMSO: dimetilsulfóxido

DO: densidad óptica

Fe: hierro

FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O: cloruro férrico hexahidrato

Fig.: Figura

G: Gauge

g: gramo

g: fuerza g

GP: glucosa-peptona

h: hora

HCl: ácido clorhídrico

HDTMA: hexadeciltrimetilamonio

KCl: cloruro potásico

KDa: kilodalton

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ : fosfato de potasio monobásico

KOH: hidróxido potásico

L: litro

log: logaritmo en base 10

M: molar

mg: miligramo

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : sulfato de magnesio heptahidratado

min: minuto

ml: mililitro

Mn: manganeso

$\mu\text{l}$ : microlitro

$\mu\text{m}$ : micrómetro

MRS: de Man, Rogosa and Sharpe

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ : fosfato disódico dodecahidratado

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : fosfato monosódico

NaCl: cloruro sódico

NBT: nitroblue tetrazolium (nitroazul de tetrazolio)

nm: nanómetro

$^\circ\text{C}$ : grado Celsius

PBS: phosphate buffered saline (tampón fosfato salino)

PMA: phorbol myristate acetate (forbol-12-miristato-13-acetato)

rpm: revoluciones por minuto

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SD: standard deviation (desviación estándar)

SDS: sodio dodecil sulfato

SFB: suero fetal bovino

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

TSA: tryptone soya agar (agar tritona soja)

TSB: trytone soya broth (caldo triptona soja)

UI: Unidades Internacionales

UFC: unidades formadoras de colonias

V: voltios

Zn: zinc



# Anexo II: Relación de cuadros

Pág

<b>Cuadro 1.</b> Bacterias probadas para el biocontrol de la saprolegniosis a través del agua en trucha arcoíris.....	31
<b>Cuadro 2.</b> Porcentaje de peces no infectados frente a la saprolegniosis en trucha arcoíris tratada con varios aislados bacterianos en el agua, respecto a los testigos. Se representa el valor p del test de Fisher en aquellos que no resultó estadísticamente significativo.....	35
<b>Cuadro 3.</b> Tolerancia, expresada en log UFC ml <sup>-1</sup> , de <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89 a diferentes concentraciones de pH, en tres experimentos independientes.....	41
<b>Cuadro 4.</b> Tolerancia, expresada en log UFC ml <sup>-1</sup> , de <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE141 a diferentes concentraciones de pH, en tres experimentos independientes.....	42
<b>Cuadro 5.</b> Crecimiento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89 en moco cutáneo e intestinal de trucha común (macho y hembra) y trucha arcoíris (hembra), expresado en log UFC ml <sup>-1</sup> .....	43
<b>Cuadro 6.</b> Crecimiento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE141 en moco cutáneo e intestinal de trucha común (macho y hembra) y trucha arcoíris (hembra), expresado en log UFC ml <sup>-1</sup> .....	43
<b>Cuadro 7.</b> Sensibilidad de <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89 y LE141 a diversos antibióticos. R: resistente, S: sensible. Entre paréntesis se indica el diámetro del halo de inhibición en cm .....	44
<b>Cuadro 8.</b> Porcentaje de peces no infectados frente a la saprolegniosis en trucha arcoíris alimentada con los aislados bacterianos de <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89 y LE141.....	45
<b>Cuadro 9.</b> Parámetros de la respuesta inmunitaria innata en trucha arcoíris cuando se administra <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89 en el agua. Los datos se representan como la mediana (mínimo: máximo).....	54

<b>Cuadro 10.</b> Parámetros de la respuesta inmunitaria innata en trucha arcoíris cuando se administra <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE141 en el agua. Los datos se representan como la mediana (mínimo: máximo).....	54
<b>Cuadro 11.</b> Resultados de las pruebas de inhibición del crecimiento del micelio de <i>Saprolegnia parasitica</i> en cañamón utilizando <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89 y LE141.....	59
<b>Cuadro 12.</b> Resultados de las pruebas de inhibición de la germinación de los quistes de <i>Saprolegnia parasitica</i> utilizando <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89 y LE141.....	59
<b>Cuadro 13.</b> Media (n=2) del diámetro (cm) de la colonia de <i>Saprolegnia parasitica</i> tras cultivar 3 días a 20 °C en una placa de agar BHI con un cultivo bacteriano de 3, 5 o 7 días.....	67
<b>Cuadro 14.</b> Acción fungicida de diferentes concentraciones de <i>Enterococcus gallinarum</i> L1, <i>Vagococcus fluvialis</i> L21 y <i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 sobre el micelio de <i>S. parasitica</i> cuando se incubaba a 20 °C durante 24 horas.....	70
<b>Cuadro 15.</b> Acción fungicida de diferentes concentraciones de <i>Enterococcus gallinarum</i> L1, <i>Vagococcus fluvialis</i> L21 y <i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 sobre el micelio de <i>S. parasitica</i> cuando se incubaba a 20 °C durante 48 horas.....	71
<b>Cuadro 16.</b> Acción fungicida de diferentes concentraciones de <i>Enterococcus gallinarum</i> L1, <i>Vagococcus fluvialis</i> L21 y <i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 sobre el micelio de <i>S. parasitica</i> cuando se incubaba a 20 °C durante 72 horas.....	71
<b>Cuadro 17.</b> Porcentaje de adhesión (media ± desviación estándar, n=3) de <i>Enterococcus gallinarum</i> L1, <i>Vagococcus fluvialis</i> L21, y <i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 al moco cutáneo de trucha común macho (MCM), moco de trucha común hembra (MCH), albúmina sérica bovina (ASB), y moco gástrico de cerdo (MGC).....	78
<b>Cuadro 18.</b> Porcentaje de reducción de la adhesión (media ± desviación estándar, n=3) de los quistes de <i>Saprolegnia parasitica</i> al moco cutáneo de trucha común macho en presencia de diferentes concentraciones bacterianas de <i>Enterococcus gallinarum</i> L1, <i>Vagococcus fluvialis</i> L21, y <i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 en condiciones de, exclusión, desplazamiento y competición.....	78
<b>Cuadro 19.</b> Bacterias probióticas utilizadas en las pruebas para el biocontrol de la saprolegniosis en trucha arcoíris indicando su origen y actividad probiótica.....	82

**Cuadro 20.** Porcentaje de peces no infectados frente a la saprolegniosis en trucha arcoíris tratada con L1, L21 y CLFP3 en el agua y en el pienso, respecto a los testigos respecto a los testigos en trucha arcoíris tratada con bacterias administradas en el agua o el pienso.....83



# Anexo III: Relación de figuras

Pág

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico de <i>Saprolegnia</i> spp. (Adaptado de Hughes, 1980).....	12
<b>Figura 2.</b> Recipiente empleado para el tratamiento “ami-momi” de las truchas.....	33
<b>Figuras 3 y 4.</b> Administración simultánea de la bacteria (Fig.2) y de las zoosporas de <i>S. parasitica</i> (Fig.3) en el agua del tanque.....	34
<b>Figura 5.</b> Trucha arcoíris con lesiones típicas de saprolegniosis 72 horas post infección. En un tanque tratado con <i>Yersenia kristensenii</i> LE58 en el agua.....	36
<b>Figura 6.</b> Log UFC ml <sup>-1</sup> de <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89 incubada con un 10 % de bilis de trucha arcoíris, se representa la media de tres estudios independientes. Las desviaciones ≤ 0,1 no se hallan respresentadas en el gráfico.....	42
<b>Figura 7.</b> Log UFC ml <sup>-1</sup> de <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE141 incubada con un 10 % de bilis de trucha arcoíris, se representa la media de tres estudios independientes. Las desviaciones ≤ 0,1 no se hallan respresentadas en el gráfico.....	42
<b>Figura 8.</b> UFC g <sup>-1</sup> de las cepas LE141 y LE89 en dos tipos diferentes de pienso T4 Optiline AE Ouro 2P (nf) T4 Optiline-sf 2P (sf) y sus testigos (PBS), almacenados a 4 °C y 20 °C, durante 28 días (UFC g <sup>-1</sup> ).....	45
<b>Figura 9.</b> Actividad fagocitaria de los macrófagos del pronefros de trucha arcoíris a la que se administró <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89 en el agua del tanque. Los datos se presentan como la media de los porcentajes de tres réplicas experimentales (desviaciones ≤ 0,10 % no se representan).....	55
<b>Figura 10.</b> Actividad fagocitaria de los macrófagos del pronefros de trucha arcoíris a la que se administró <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE141 en el agua del tanque. Los datos se presentan como la media de los porcentajes de tres réplicas experimentales (desviaciones ≤ 0,10 % no se representan).....	55
<b>Figura 11.</b> Macrófago de trucha arcoíris fagocitando bolitas de látex (tinción Diff-Quick).....	56

<b>Figura 12.</b> Explosión respiratoria de los macrófagos del pronefros en trucha arcoíris a la que se le administró <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89 o LE141 en el agua del tanque. Los datos se presentan como la media $\pm$ desviación estándar de tres réplicas.....	56
<b>Figura 13.</b> Producción de sideróforos por <i>Pseudomonas fluorescens</i> LE89 y LE141 en el medio CAS.....	57
<b>Figura 14.</b> Péptido presente en la fracción del 45-60 % de precipitación protéica del sobrenadante de LE141 (gel de poliacrilamida).....	58
<b>Figura 15.</b> Cambio de color en el medio CAS, que indica la presencia de sideróforos, al añadir el eluido de la fracción protéica del 30 % de LE89 que inhibe a <i>S. parasitica</i> .....	58
<b>Figura 16.</b> Inhibición de <i>Saprolegnia parasitica</i> por <i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3 en agar BHI tras cultivar 3 días a 20 °C: a) inhibición del crecimiento en una placa en la que previamente se cultivó la bacteria durante 7 días; b) testigo sin presencia de la bacteria.....	67
<b>Figura 17.</b> Inhibición del crecimiento miceliar de <i>Saprolegnia parasitica</i> en cañamón utilizando varias diluciones de <i>Enterococcus gallinarum</i> L1, <i>Vagococcus fluvialis</i> L21.....	68
<b>Figura 18.</b> Inhibición del crecimiento miceliar de <i>Saprolegnia parasitica</i> en cañamón utilizando varias diluciones de <i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3.....	68
<b>Figura 19.</b> Inhibición de la germinación de los quistes de <i>Saprolegnia parasitica</i> utilizando varias diluciones de <i>Enterococcus gallinarum</i> L1, <i>Vagococcus fluvialis</i> L21.....	69
<b>Figura 20.</b> Inhibición de la germinación de los quistes de <i>Saprolegnia parasitica</i> utilizando varias diluciones de <i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3.....	69
<b>Figura 21.</b> Inhibición del crecimiento miceliar de <i>Saprolegnia parasitica</i> en cañamón utilizando varias diluciones de los sobrenadantes del cultivo de <i>Enterococcus gallinarum</i> L1, <i>Vagococcus fluvialis</i> L21 y <i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3.....	72
<b>Figura 22.</b> Inhibición de la germinación de los quistes de <i>Saprolegnia parasitica</i> utilizando varias diluciones de los sobrenadantes del cultivo <i>Enterococcus gallinarum</i> L1, <i>Vagococcus fluvialis</i> L21 y <i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3.....	73

**Figura 23.** Quistes de *Saprolegnia parasitica* teñidos con Syto 9®, recuento en cámara de Neubauer (100x).....76

**Fotografías:**

C. González Palacios: Fig. 5, 11, 14, 15, 23.

Dr. J. M. Aller Gancedo: Fig. 2, 3, 4, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22.



# Anexo IV: Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales y publicaciones previstas en revistas JCR

❖ “Parámetros inmunológicos en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tras la administración con la dieta de aislados bacterianos antagonistas de *Saprolegnia parasitica*”

González Palacios, C., Fregeneda Grandes, J.M. y Aller Gancedo, J.M.

Póster en el Congreso: XIV Congreso Nacional de Acuicultura. Gijón. 23-25 de Diciembre de 2013.

❖ “Control de la infección por *Saprolegnia parasitica* con bacterias”.

C. González-Palacios, J.M. Fregeneda-Grandes y J.M. Aller-Gancedo

Comunicación oral en el XV congreso Nacional y I congreso Ibérico de Acuicultura. Huelva. 13-16 Octubre de 2015.

❖ “*In vitro* inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* by three probiotics against rainbow trout lactococcosis and European sea bass vibriosis”.

González Palacios, C., Fregeneda Grandes, J.M., Gutiérrez-Falcón, A., Sánchez Henao, A, y Aller Gancedo, J.M.

Póster en el 18<sup>th</sup> International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. Belfast. 4-8 de Septiembre 2017 (Aceptado pendiente de presentación).

❖ “Propiedades de dos aislados de *Pseudomonas fluorescens* LE 89 y LE 141 para su empleo como probióticos frente a *S. parasitica* en trucha arcoíris añadidas al pienso”.

González Palacios, C., Fregeneda Grandes, J.M. y Aller Gancedo, J.M.

Póster en el XVI Congreso Nacional de Acuicultura. Zaragoza. 3-5 Octubre de 2017 (Pendiente de aceptación).

❖ “Control de la saprolegniosis en trucha arcoíris con probióticos eficaces frente a vibriosis en lubina y lactococcosis en trucha arcoíris”.

González Palacios, C., Fregeneda Grandes, J.M., Gutiérrez-Falcón, A., Pérez-Sánchez, T., J.L., Aller Gancedo, J.M.

Póster en el XVI Congreso Nacional de Acuicultura. Zaragoza. 3-5 Octubre de 2017 (Pendiente de aceptación).

Se tiene previsto publicar los siguientes trabajos relacionados con esta tesis doctoral en revistas del JCR:

❖ Biocontrol of the saprolegniosis in rainbow trout using *in vitro* inhibitory bacteria against *Saprolegnia parasitica*.

❖ *Pseudomonas fluorescens* LE89 and LE141 mechanism to saprolegniosis control in rainbow trout.

❖ *In vitro* and *in vivo* inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* using probiotic bacteria for vibriosis and lactococcosis control.

# BIBLIOGRAFÍA



Mosaico procedente de Pompeya. Museo Arqueológico Nacional de Napoles (Italia).

Massimo Finizio para Wikipedia.



ABBASS, A., SHARIFUZZAMAN, S.M. y AUSTIN, B. (2010). Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 33: 31-37

ALLER-GANCEDO, J.M., FREGENDA-GRANDES, J.M., GONZÁLEZ-PALACIOS, C., GARCÍA-IGLESIAS, M.J., PÉREZ-ORDOYO, L.I. (2016). First record of an outbreak of saprolegniosis by *Saprolegnia parasitica* in *Pseudochondrostoma duriense* (Coelho, 1985) (Cyprinidae). *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 36, 95-100

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

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

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

ÁLVAREZ, F., RAZQUIN, B., VILLENA, A., LOPÉZ-FIERRO, P. y ZAPATA, A. (1988). Peripheral lymphoid organs and differential leukocyte counts in *Saprolegnia*-infected brown trout, *Salmo trutta fario*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 18: 181-193

ÁLVAREZ, F., VILLENA, A., ZAPATA, A. y RAZQUIN, B. (1995). Histopathology of the thymus in *Saprolegnia*-infected wild brown trout, *Salmo trutta*, L. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 47: 163-172

ANDREW, A.G., HULL, C.M., ROLLEY, N.J., PARKER, J.E. NES, W.D., SMITH, S.N., KELLY, D.E., KELLY, S.L. (2014). Clotrimazole as a potent agent for treating the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* through inhibition of sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51). *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 6154-6166

ARIJO, S., CHAMBRILLON, M., DÍAZ-ROSALES, P. y AUSTIN, B. (2008). Subcellular components of *Vibrio harveyi* and probiotics induce immune responses in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *V. harveyi*. *Journal of Fish Diseases*, 31: 579-590

ASKELAND, R.A. y MORRISON, S.M. (1983). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 1802-1807

AUSTIN, B. y AUSTIN D.A. (2012). Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. Springer-Praxis, Godalming

AUSTIN, B., STUCKEY, F., ROBERTSON, P. A. W., EFFENDI, I., GRIFFITH, D. R. W. (1995). A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases*, 18: 93-96

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

BILLS, T.D, MARKING, L.L. y CHANDLER, J.H. (1977). Malachite green: its toxicity to aquatic organisms, persistence and removal with activated carbon. Investigation in Fish Control, US Fish and Wildlife Leaflet N° 75

BLY, J.E., LAWSON, L.A., DALE, D.J., SZALAI, A.J., DURBUROW, R.M. y CLEM, L.W. (1992). Winter saprolegniosis in channel catfish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 13: 155-164

BLY, J.E., LAWSON, L.A., ESSAM, S.M.-A. y CLEM, L.W. (1994). Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, immunity to *Saprolegnia* sp. *Journal of Applied Aquaculture*, 3: 35-50

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

BOOTSMA, R. (1973). Infections with *Saprolegnia* in pike culture (*Esox Lucius*, L.). *Aquaculture*, 2: 385-394

BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72: 248-254

BRUNO, D.W. VAN WEST, P. y BEAKES, G. (2011). *Saprolegnia* and other Oomycetes. En BRUNO, D.W. y WOO, P.T.K., *Fish Diseases and Disorders. Vol. 3 Viral, bacterial and fungal infections*. 2<sup>nd</sup> edn. CAB International, pp. 669-720

BRUNO, D.W. y STAMPS, D.J. (1987). Saprolegniasis of atlantic salmon, *Salmo salar* L., fry. *Journal of Fish Diseases*, 10: 513-517

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

- BUCKING, C. y WOOD, C.M. (2009). The effect of postprandial changes in pH along the gastrointestinal tract on the distribution of ions between the solid and fluid phases of chyme in rainbow trout. *Aquaculture Nutrition*, 15: 282-296
- BURGAIN, J., GAIANI, C., LINDER, M., SCHER, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104: 467-483
- CARBAJAL-GONZÁLEZ, M.T. (2013). 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, Universidad de León, España
- 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*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 104: 35-44
- 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 and rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, 96: 125-135
- CHABRILLÓN, M., RICO, R.M., BALEBONA, M.C. y MORIÑIGO, M.A. (2005). Adhesion to sole, *Solea senegalensis* kaup, mucus and microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, 28: 229-237
- CHUKANHOM, K., BORISUTHPETH, P. y HATAI, K. (2005). Antifungal activities and aroma components from *Alpinia galangal* against water molds. *Biocontrol Science*, 3: 105-109
- CHUNG, S. y SECOMBES, C.J. (1998). Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 89: 539-544
- CLEMMENSEN, S., JENSEN, J.C., JENSEN, N.J., MEYER, O., OLSEN, P. y WÜRTZEN, G. (1984). Toxicological studies on malachite green: a triphenylmethane dye. *Archives of Toxicology*, 56: 43-45
- CROSS, M.L. y WILLOUGHBY, L.G. (1989). Enhanced vulnerability of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to *Saprolegnia* infection, following treatment of the fish with an androgen. *Mycological Research*, 93: 373-402

- DAVIS, H.S. y LAZAR, E.C. (1941). A new fungus disease of trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, 70: 246-271
- DE BRUIJN, I., DE KOCK, M.J.D., DE WAARD, P., VAN BEEK, T.A. y RAAIJMAKERS, J.M. (2008). Massetolide A Biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*, 190: 2777-2789
- DE BRUIJN, I., DE KOCK, M.J.D., YANG, M. DE WAARD, P. y VAN BEEK, T.A. (2007). Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Molecular Microbiology*, 63: 417-428
- DEL RÍO-GONZÁLEZ, M.L. (2004). Sistemas de captación de hierro en *Haemophilus parasuis*. Tesis doctoral. Universidad de León, España
- DÍAZ-ROSALES, P., SALINAS I., RODRÍGUEZ, A., CUESTA, A., CHABRILLÓN, M., BALEBONA, C., MORIÑIGO, A. y ESTEBAN, M.A. (2006). Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) Innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish & Shellfish Immunology*, 20: 482-492
- 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 Genetics and Biology*, 44: 585-601
- DRESCHSEL, H. y JUNG, G. (1998). Peptide siderophores. *Journal of Peptide Science*, 4: 147-181
- ELDAR, A., GHITTINO, C., ASANTA, L., BOZZETTA, E., GORIA, M., PREARO, M. y BERCOVIER, H. (1996). *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Current Microbiology*, 32: 85-88
- ELLIS, A. E. (1990). Lysozyme assays. En STOLEN, T. C., FLETCHER, T. C., ANDERSON, D. P., ROBERSON, B.S. y VAN MUISWINKEL, W.B. *Techniques in Fish Immunology*, pp. 101-103. SOS Publications, Fair Haven
- FERNANDES, C., LALITHA, V.S. y RAO, K.V.K. (1991). Enhancing effect of malachite green on the development of hepatic pre-neoplastic lesions induced by N-nitrosodiethylamine in rats. *Carcinogenesis*, 12: 839-845
- FIERRO-CASTRO, M.C. (2009). Utilización de líneas celulares de *Oncorhynchus mykiss* para el estudio de la acción y para la selección de agentes inmunoestimulantes utilizables en acuicultura. Tesis doctoral, Universidad de León, España

- 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 inciense. *Aquaculture*, 221: 157-166
- FREGENEDA-GRANDES, J.M. (1998). Presencia de Saprolegnia en agua del río Luna (León). Características ultraestructurales y patogenicidad experimental para la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de las cepas potencialmente patógenas. Tesis doctoral, Universidad de León, España
- FREGENEDA-GRANDES, J.M., CARBAJAL-GONZÁLEZ, M.T. y J.M., ALLER-GANCEDO, J.M. (2009). Prevalence of serum antibodies against *Saprolegnia parasitica* in wild and farmed brown *Salmo trutta*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 83: 17-22
- FREGENEDA-GRANDES, J.M., FERNÁNDEZ-DÍEZ, M. y ALLER-GANCEDO, J.M. (2001). Experimental pathogenity 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. *Journal of Fish Diseases*, 24: 351-359
- FULLER, R. (1992). *Probiotics: The Scientific Basis*, Chapman and Hall, London
- GATESOUBE, F. J. (1991). The effect of three strains of lactic acid bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 96: 335-342
- GATESOUBE, F.J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147-165
- GIRI, S.S., SUKUMARAN, V. y OVIYA, M. (2012). Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34: 660-666
- GONZÁLEZ, C.J., ENCINAS, J.P., GARCÍA-LÓPEZ, M.L. y OTERO, A. (2000). Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiology*, 17: 383-391
- GRAM, L., LØVOLD, T., NIELSEN, J., MELCHIORSEN, J. y SPANGGAARD, B. (2001). In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture*, 199: 1-11

GRAM, L., MELCHIORSEN, S., SPANGGAARD, B., HUBER, I. y NIELSEN, T.F. (1999). Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 969-973

GURUSIDDAIAH, S., WELLER, D.M., SARKAR, A. y COOK, R.J. (1986). Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 29: 488-495

HANSEN G.H. y OLAFSEN, J.A. (1999). Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology*, 38: 1-26

HASHEMI, K.S.M., SADEGHPOUR, H.M. y GHOLAMPOUR, A.I. (2012). Isolation of *Saprolegnia* and the influence of root ethanolic extract of *Ruta graveolans* on *Saprolegnia* Spp. growth. *International Journal of Bioscience, Biochemistry, and Bioinformatics*, 18: 19-23

HATAI, K. y WILLOUGHBY, L.G. (1988). *Saprolegnia parasitica* from rainbow trout inhibited by the bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 8: 27-29

HATAI, K. y EGUSA, S. (1977). Studies on visceral micosis of salmonids fry II. *Fish Pathology*, 11: 187-193

HATAI, K. y HOSHIAI, G.I. (1994). Pathogenicity of *Saprolegnia parasitica* Coker. En MUELLER G. J. *Salmon saprolegniasis*. US Department of Energy, Portland, pp. 87-98

HATTEN, F., FREDIKSEN, A., HORDVIK, I. y ENDRESEN, C. (2001). Presence of IgM in cutaneous mucus of Atlantic salmon, *Salmo salar*. Serum IgM is rapidly degrades when added to gut mucus. *Fish & Shellfish Immunology*, 11: 257-268

HEIKKINEN, J., MUSTONEN, S.M., ESKELINEN, P., SUNDBERG, L.-R. y VON WRIGHT, A. (2013). Prevention of fungal infestation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs using UV irradiation of the hatching water. *Aquacultural Engineering*, 55: 9-15

HEIKKINEN, J., TIROLA, M., MUSTONEN, S.M. y ESKELINEN, P. (2016). Suppression of *Saprolegnia* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs using protective bacteria and ultraviolet irradiation of the hatchery water. *Aquaculture Research*, 47: 925-939

HOLT R.A., ROHOVEC J.S. y FRYER J.L. (1993). Bacterial cold-water disease. En *Bacterial Diseases of Fish*. Ed. Inglis, V., Roberts, R.J. y Bromage N.R, pp. 3-23. Blackwell Scientific Publications, Oxford

- HOSHINA, T., OOKUBA, M. (1956). On a fungal disease of eel. *Journal of the Tokyo University of fisheries*, 42: 1-13
- HULVEY, J.P., PADGETT, D.E. y BAILEY, J.C. (2007). Species boundaries within *Saprolegnia* (Saprolegniales, Oomycota) based on morphological and DNA sequence data. *Mycologia*, 99: 421-429
- HUSSEIN, M.M.A. y HATAI, K. (2001). *In vitro* inhibition of *Saprolegnia* by bacteria isolated from lesions of salmonids with saprolegniosis. *Fish Pathology*, 36: 73-78
- IRIANTO, A. y AUSTIN, B. (2002a). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 25: 333-342
- IRIANTO, A. y AUSTIN, B. (2002b). Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 25: 633-642
- IRIANTO, A., ROBERTSON, P.W.A. y AUSTIN, B. (2003). Oral administration of formalin-inactivated cells of *Aeromonas hydrophila* A3-51 controls infection by atypical *A. salmonicida* in goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 26: 117-120
- JIANG, R.H.Y., DE BRUIJN, I., HAAS, B.J., BELMONTE, R., LÖBACH, L., CHRISTIE, J., VAN DEN ACKERVENKEN, G., BOTTIN, A., BULONE, V., DÍAZ-MORENO, S.M., DUMAS, B., FAN, L., GAULIN, E., GOVERS, F., GRENVILLE-BRIGGS, L.J., HORNER, N.R., LEVIN, J.Z., MAMMELA, M., MEIJER, J.G., MORRIS, P., NUSBAUM, C., OOME, S., PHILLIPHS, A.J., VAN ROOYEN, D., RZESZUTEK, E., SARAVIA, M., SECOMBES, C.J., SEIDL, M.F., SNEL, B., STASSEN, J.H.M., SYKES, S., TIPATHYS, S., VAN DER BERG, H., VEGA-ARREGUIN, J.C., WAWRA, S., YOUNG, S.K., ZENG, Q., DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. y RUSS, C. (2013). Distinctive expansion of potential virulence genes in the genome of the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica*. *PLoS Genetics*, 9: e1003272.
- JOHNSEN, B.O. (1978). The effect of an attack by the parasite *Gyrodactylus salaris* on the population of salmon parr in the river Lakselva, Misvaer in northern Norway. *Journal of Arctic Biology*, 11: 7-9
- KESACORDI-WATSON A., KASPAR H., LATEGAN M. 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 Science*, 72: 28-32

- KHOSRAVI, A.R., SHOKRI, H., SHARIFROHANI, M., MOUSAVI, H. y MOOSAVI, Z. (2012). Evaluation of the antifungal activity of *Zataria multiflora*, *Geranium herbarium*, and *Eucalyptus calmadolensis* essential oils on *Saprolegnia parasitica*-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Foodborne pathogens and Disease*, 9: 674-679
- KIM, D.-H. y AUSTIN, B. (2006). Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish & Shellfish Immunology*, 21: 513-524
- KIRK, P.M., CANNON, P.F., MINTER, D.W. y STALPERS, J.A. (2008). *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. CAB Internacional, Wallingford. Oxon OX10 8DE. UK
- KITANCHAROEN, N., YAMAMOTO, A. y HATAI, K. (1997). Fungicidal effect of hydrogen peroxide on fungal infection of rainbow trout eggs. *Mycoscience*, 38: 375-378
- 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*. *Journal of Applied microbiology*, 111: 266-277
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685
- LANGE, S., GUDMUNSDOTTIR, B.K. y MAGNADOTTIR, B. (2001). Humoral immune parameters of cultured Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 11: 523-535
- LATEGAN, M.J. y GIBSON, L.F. (2003). Antagonistic activity of *Aeromonas media* strain A199 against *Saprolegnia* sp., an opportunistic pathogen of the eel, *Anguilla australis* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, 26: 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
- LATEGAN, M.J., TORPY, F.R. y GIBSON, L.F. (2004a). Biocontrol of saprolegniosis in silver perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell) by *Aeromonas media* strain A199. *Aquaculture*, 235: 77-88
- LATEGAN, M.J., TORPY, F.R. y GIBSON, L.F. (2004b). Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas media* strain A199. *Aquaculture*, 240: 19-27

- LAZADO, C.C. y CAIPANG, C.M.A. (2014). Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish & shellfish immunology*, 39: 78-89.
- LIU, L.-L., LU, F.-P., LIU, H. y ZHOU, C. (2011). Selection of antagonistic bacteria for *Saprolegnia parasitica* and isolation of its antibiotic protein. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 26: 18-21
- LIU, Y., RZESZUTEK, E., VAN DER VOORT, M., WU, C.-H., THOEN, E., SKAAR, I., BULONE, V., DORRESTEIN, P., RAAIJMAKERS, J.M. y DE BRUIJN, I. (2015). Diversity of Aquatic *Pseudomonas* Species and Their Activity against the Fish Pathogenic Oomycete *Saprolegnia*. *PLoS One* 10: e0136241
- LORENZEN, E. (1994). Studies on *Flexibacter psychrophilus* in relation to rainbow trout fry syndrome (RTFS), Tesis doctoral, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen
- LORENZEN, E. y OLESEN, N.J. (1997). Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome II: serological studies. *Diseases of Aquatic Organisms*, 31: 209-220
- MADRID, A., GODOY, P., GONZÁLEZ, S., ZAROR, L., MOLLER, A., WERNER, E., CUELLAR, M., VILLENA, J. y MONTENEGRO, I. (2015). Chemical characterization and anti-oomycete activity of *Laureliopsis philippiana* essential oils against *Saprolegnia parasitica* and *S. australis*. *Molecules*, 20: 8033-8047
- MATHEWS, E.S., WARINNER, J.E. y WEEKS, B. A. (1990). Assays of Immune Function in Fish Macrophages. En STOLEN, T.C., FLETCHER, T.C., ANDERSON, D.P., ROBERSON, B.S. y VAN MUISWINKEL, W.B. *Techniques in Fish Immunology*, pp. 155-163. SOS Publications, Fair Haven.
- MATTHIJS, S., TEHRANI, K.A., LAUS, G., JACKSON, R.W., COOPER, R.M. y CORNELIS, P. (2007). Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity. *Environmental microbiology*, 9: 425-434
- MERRIFIELD, D., DIMITROGLOU, A., FOEY, A., DAVIES, S.J., BAKER, R.T.M., BØGWALD, J., CASTEUX, M. y RINGØ, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications of salmonids. *Aquaculture*, 302: 1-18
- MEYER, F.P. y JORGENSON, T.A. (1983). Teratological and other effects of malachite green on development of rainbow trout and rabbits. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112: 818-824

- MOGHADDAN, A.A., HAJIMORADDLOO, A., GHIASI, M. y GHORBANI, R. (2012). *In vitro* inhibition of growth in *Saprolegnia* sp. isolated from the eggs of Persian Sturgeon *Acipenser persicus* (Pisces: Acipenseriformes) by *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC:1430). *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 11: 245-252
- MOLINA, F.I.; JONG, S.-C. y MA, G.A. (1995). Molecular characterization and identification of *Saprolegnia* by restriction analysis of genes coding for ribosomal RNA. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68: 65-74
- NAYAK, S.K. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 29: 2-14
- NEISH, G.A. (1976). Observations on the pathology of saprolegniasis of pacific salmon and on the identity of the fungi associated with this disease. Tesis doctoral. The University of British Columbia, Vancouver, Canada
- NEISH, G.A. y HUHGES, G.C. (1980). Fungal diseases of fishes. *Diseases of fishes*. T.W.F. Publications, Neptune, New Jersey
- NEMATOLLAHI, A., DECOSTERE, A., PASMANS, F. y HAESEBROUCK, F. (2003). *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, 26: 563-574
- NEWAJ-FYZUL, A., AL-HARBI, A.H. y AUSTIN, B. (2014). Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*, 431: 1-11
- NIKOSKELAINEN, S., SALMINEN, S., BYLUNG, G. y OUWEHAND, A. (2001). Characterization of the Properties of Human- and Dairy-Derived Probiotics for Prevention of Infectious Diseases in Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2430-2435
- NOGA, E. J., DYKSTRA, M. J. (1986). Oomycete fungi associated with ulcerative mycosis in menhaden, *Brevoortia tyrannus* (Latrobe). *Journal of Fish Diseases*, 9: 47-53.
- NURHAJATI, J., ATIRA, I.N.P. y KADEK INDAH, D.G. (2012). The curative action of *Lactobacillus plantarum* FNCC 226 to *Saprolegnia parasitica* A3 on catfish (*Pangasius hypophthalmus*, Sauvage). *International Food Research Journal*, 19: 1723-1727
- PANIGRAHI, A., KIRON, V., KOBAYASHI, T., PUANGKAEW, J., SATOH, S. y SIGUTA, H. (2004). Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102: 379-388

- PANIGRAHI, A., KIRON, V., PUANGKAEW, J., KOBAYASHI, T., SATOH, S. y SUGITA, H. (2005). The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 243: 241-254
- PÉREZ-SÁNCHEZ, T., BÁLCAZAR, J.L., GARCÍA, I., HALAIHEL, N., VENDRELL, D., DE BLAS, I., MERRIFIELD, D.L. y RUIZ-ZARZUELA, I. (2011a). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *Journal of Fish Diseases*, 34: 499-507
- PÉREZ-SÁNCHEZ, T., BÁLCAZAR, J.L., MERRIFIELD, D.L., CARNEVALI, O., GIOACCHINI, G., D., DE BLAS, I. y RUIZ-ZARZUELA, I. (2011b). Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 31: 196-201
- PÉREZ-SÁNCHEZ, T., RUIZ-ZARZUELA, I., DE BLAS, I. y BÁLCAZAR, J.L. (2014). Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Reviews in aquaculture*, 6: 133-146
- 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
- PICKERING, A.D. y RICHARDS, R.H. (1980). Factors influencing the structure, function and biota of the salmonid epidermis. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 79B: 93-104
- PIETERS, N., BRUNT, J., AUSTIN, B. y LYNDON, A.R. (2008). Efficacy of in-feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 105: 723-732
- RICHARDS, R.H. y PICKERING, A.D. (1978). Frequency and distribution patterns of *Saprolegnia* infection in wild and hatchery-reared brown trout *Salmo trutta* L. and char *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 1: 69-82
- RINGØ, E., STRØM, E. y TABACHEK, J.-A. (1995). Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture Research*, 26: 773-789

- RODRÍGUEZ-APARICIO, L.B.; LUENGO, J.M., GONZÁLEZ-CLEMENTE, C. y REGLERO, A. (1992). Purification and Characterization of the Nuclear Cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 9257-9263.
- ROSAS-LEDESMA, P., LEÓN-RUBIO, J.M., ALARCÓN, F.J., MORIÑIGO, M.A. y BALEBONA M.C. (2012). Calcium alginate capsules for oral administration of fish probiotic bacteria: assessment of optimal conditions for encapsulation. *Aquaculture Research*, 43: 106-116
- SALINAS, I., DÍAZ-ROSALES, P., CUESTA, A., MESEGUER, J., CHABRILLÓN, M., MORIÑIGO, M.A. y ESTEBAN, M.A. (2006). Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of teleost fish (*Sparus aurata* L.) *Veterinary Immunology and Fish Immunopathology*, 111: 279-286
- SANDOVAL-SIERRA, J.V., MARTÍN, M.P. y DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. (2014). Species identification in the genus *Saprolegnia* (Oomycetes): Defining DNA-based molecular operational taxonomic units. *Fungal biology*, 118: 559-578
- SCHERIER, T.M., RACH, J.J. y HOWE, E. (1996). Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. *Aquaculture*, 140: 323-331
- SHARIFUZZAMAN, S.M., ABBASS, A., TINSLEY, J.W. TINSLEY, J.W. y AUSTIN, B. (2011). Subcellular components of probiotics *Kocuria* SM1 y *Rhodococcus* SM2 induce protective immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) against *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30: 347-353
- SHARIFUZZAMAN, S.M. y AUSTIN, B. (2009). Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology*, 27: 440-5
- SHARIFUZZAMAN, S.M. y AUSTIN, B. (2010). Development of protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Vibrio anguillarum* following use to the probiotic *Kocuria* SM1. *Fish & Shellfish Immunology*, 29: 212-216
- SINGHAL, R.N., JEET, S., DAVIES, R.W. (1987). Experimental transmission of *Saprolegnia* and *Achlya* to fish. *Aquaculture*, 64: 1-7
- SMITH, P. y DAVEY, S. (1993). Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad. *Journal of Fish Diseases*, 16: 521-524

- SMITH, S. N., ARMSTRONG, R. A., SPRINGATE, J., & BARKER, G. (1985). Infection and colonization of trout eggs by *Saprolegniaceae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 85: 719-723
- SON, V.M., CHANG, C.-C., WU, M.-C., GUU, Y.-K., CHIU, C.-H. y CHENG, W. (2009). Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26: 691-698
- SONG, Z., WU, T., CAI, L., ZHANG, L. y ZHENG, X. (2006). Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricum* on the growth performance and humoral immune response in *Miichthys miiuy*. *Journal of Zhejiang University*, 7: 596-602.
- SORROZA, L. (2012). Propuesta de nuevas cepas probióticas para su uso en acuicultura. Tesis doctoral, Universidad de las Palmas de Gran Canaria, España
- SORROZA, L., PADILLA, D., ACOSTA, F., ROMÁN, L., GRASSO, V., VEGA, J. y REAL, F. (2012). Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. *Veterinary Microbiology*, 155: 369-373
- SORROZA, L., REAL, F., ACOSTA, F., ACOSTA, B., DÉNIZ, S., ROMÁN, L., EL-AAMRI, F. y PADILLA, D. (2013). A probiotic potential of *Enterococcus gallinarum* against *Vibrio anguillarum* infection. *Fish Pathology*, 48: 9-12
- SPANGGAARD B., HUBER I., NIELSEN J., SICK E.B., PIPPER C.B., MARTINUSSEN T., SLIERENDRECHT W.J. y GRAM L. (2001). The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environmental Microbiology*, 3: 755-765
- SUGIURA, S.H., ROY, P.K. y FERRARIS, R.P. (2006). Dietary acidification enhances phosphorus digestibility  $H^+ / K^+$ -ATPase expression in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 209: 3719-3728
- TAKEMOTO, J.Y., BALLIO, A. y ISOGAI, A. (1995). Other lipopeptides. *Science*, 267: 605
- TIFFNEY, W.N. (1939). The identity of certain species of the *Saprolegniaceae* parasitic to fish. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society*, 55: 134-151
- TOOR, H.S., SEHGAL, H. y SEHDEV, R.S. (1983). A case study of acute fish diseases in tanks loaded with high levels of organic manure. *Aquaculture*, 35: 277-282

UDOMKUSONSRI, P., TRONGVANICHNAM, K., LIMPOKA, M. y KLANGKAEN, N. (2007). *In vitro* efficacy of the antifungal activity of some Thai medicinal-plants on the pathogenic fungus *Saprolegnia parasitica* H2, from fish. *Kasetsart Journal: Natural Science*, 41: 56-61

VALTONEN, E. T., RINTAMÄKI, P. y KOSKIVAARA, M. (1992). Occurrence and pathogenicity of *Yersinia ruckeri* at fish farms in northern and central Finland. *Journal of Fish Diseases*, 15: 163-171

VAN DE MORTEL, J.E., TRAN, H., GROVERS, F., RAAIJMAKERS, J.M. (2009). Cellular Responses of the Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans* to Cyclic Lipopeptide Surfactants and Their Dependence on G Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 4950-4957

VAN DER BERG, A.H., MCLAGGAN, D., DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. y VAN WEST, P. (2013). The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. *Fungal Biology Reviews*, 27: 33-42

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. *Journal of Fish Diseases*, 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

VERSCHUERE, L., ROMBAUT, G., SORGELOOS, P. y VERSTRAETE, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 655-671

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

VON SIEBENTHAL, B.A., JACOB, A. y WEDEKIND, C. (2009). Tolerance of whitefish embryos to *Pseudomonas fluorescens* linked to genetic and maternal effects, and reduced by previous exposure. *Fish & Shellfish Immunology*, 26: 531-535

WANG, F. y ZHANG Q. (2017). *In vitro* inhibition of *Saprolegnia* sp. by an antifungal peptide from *Pseudomonas protegens* XL03. *North American Journal of Aquaculture*, 79: 168-175

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

- WILLOUGHBY, L.G. (1985). Rapid preliminary screening of *Saprolegnia* on fish. *Journal of Fish Diseases*, 8: 473-476
- WILLOUGHBY, L.G. (1994). Fungi and fish diseases. Pices Press, Stirling
- WILLOUGHBY, L.G. y PICKERING, A.D. (1977). Viable *Saprolegnia* spores on the epidermis of the salmonid fish *Salmo trutta* and *Salvelinus alpinus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 68: 91-95
- WILLOUGHBY, L.G. y ROBERTS, R.J. (1992). Towards strategy use of fungicides against *Saprolegnia parasitica* in salmonid fish hatcheries. *Journal of Fish Diseases*, 15: 1-13
- 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*). *Transactions of the British Mycological Society*, 90: 63-73
- YAMANE, K., SUZUKI, H. y NISIZAWA, K. (1970). Purification and Properties of Extracellular and Cell-bound Cellulase Components of *Pseudomonas fluorescens* var. cellulose. *The Journal of Biochemistry*, 67: 19-35
- YAMANE, K. y SUZUKI, H. (1988). Cellulases of *Pseudomonas fluorescens* var. *Cellulosa*. *Methods in Enzymology*, 160: 200-210
- ZAR, J.H. (1984). *Biostatistical Analysis*, 2<sup>nd</sup> edn. London, UK: Prentice-Hall.
- ZHANG, S.-J., YANG, X.-L., LI, D. y GAO, P. (2008). Screening of antagonistic bacterium strain against saprolegniosis and the preliminary study of *in vitro* antagonistic activity. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 32: 301-307