



**Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

## ÍNDICE

<b>I. Resumen/ Abstract</b>	<b>2</b>
I. Resumen	2
II. Abstract	3
<b>II. Introducción y justificación</b>	<b>4</b>
<b>III. Objetivos</b>	<b>15</b>
<b>IV. Material y métodos</b>	<b>15</b>
I. Recepción de peces	15
II. Diagnóstico/Análisis microbiológico	16
III. Selección de cepas candidatas con propiedades antibacterianas (Pruebas de Inhibición)	17
IV. Caracterización de las cepas candidatas seleccionadas con efecto inhibitorio frente a <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	18
<b>V. Resultados y discusión.</b>	<b>18</b>
<b>VI. Conclusiones</b>	<b>23</b>
I. Conclusiones	23
II. Conclusions	23
<b>VII. Valoración personal</b>	<b>23</b>
<b>VIII. Bibliografía</b>	<b>25</b>
<b>IX. Anexos</b>	<b>31</b>
I. Anexo I	31
II. Anexo II	32

## I. RESUMEN

La acuicultura se ha convertido en un importante sector económico con un incremento muy importante en la productividad a nivel mundial. Como consecuencia, se ha producido la aparición de una gran variedad de agentes patógenos y fenómenos de resistencias microbianas. Estos impactos, se han producido principalmente por el uso indiscriminado de agentes quimioterápicos frente a bacterias productoras de enfermedades en acuicultura. Dentro de éstas, predominan las bacterias Gram negativas, y concretamente una de ellas afecta a la mayoría de los salmones que se cultivan en piscifactorías de aguas continentales, *Flavobacterium psychrophilum*, el agente etiológico de la Enfermedad de Aguas Frías.

Al observarse estas consecuencias, se han puesto en marcha numerosas estrategias para el control y prevención de estas enfermedades bacterianas limitando el uso de los antibióticos. Entre estas opciones destacan el uso de vacunas, inmunoestimulantes y probióticos.

El uso de probióticos, que son capaces de controlar la proliferación de agentes patógenos si son administrados de manera continua, pueden ser usados como un tratamiento alternativo al uso de antibióticos y ser una estrategia para prevenir enfermedades bacterianas en acuicultura.

El efecto beneficioso de los probióticos radica en la competición por receptores específicos en la superficie de la mucosa con agentes patógenos, la competición por nutrientes, la producción de factores inhibitorios (bacteriocinas) o por un incremento de la respuesta inmune del individuo. En los salmones, estos efectos suelen presentarse como un buen estado de salud, un incremento en la resistencia ante enfermedades, un incremento en el crecimiento, una mayor utilización del alimento, una mejora en la composición de la carne, la disminución de malformaciones, etc.

En el presente trabajo se ha realizado un estudio preliminar con el fin de seleccionar la presencia de cepas bacterianas obtenidas de la microbiota endógena con potencial efecto probiótico frente al agente etiológico *Fl. psychrophilum*.

## ABSTRACT

### Preliminary characterization of candidate probiotic strains against *Flavobacterium psychrophilum*

Aquaculture has become an important economic sector with a major in worldwide productivity increase. Consequently, there has been the emergence of a wide variety of pathogens and microbial resistance phenomena. These impacts have occurred mainly by the indiscriminate use of chemotherapeutic agents against disease-producing bacteria in aquaculture. Among these, dominated by Gram negative bacteria, in particular one affecting most of salmonids grown in fish farms inland water, *Flavobacterium psychrophilum*, the etiologic agent of the Cold Water Disease.

By observing these consequences, they have launched numerous strategies for the control and prevention of these bacterial diseases limiting the use of antibiotics. These options include the use of vaccines, immunostimulants and probiotics.

The use of probiotics, which are capable of controlling the proliferation of pathogens if administered continuously, can be used as an alternative treatment to antibiotics and be a strategy to prevent bacterial diseases in aquaculture.

The beneficial effect of probiotics is in competition for specific receptors on the mucosal surface with pathogens, competition for nutrients, production of inhibitory factors (bacteriocins) or by an increase of the immune response of the individual. In salmonids, these effects are often presented as a good state of health, increased resistance to disease, increased growth, increased feed utilization, improved carcass composition, decreased malformations...

A preliminary study has been done in order to select the presence of bacterial strains obtained from the endogenous microbiota with probiotic potential effect against etiologic agent *Fl. psychrophilum*.

## II. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

La acuicultura, se define según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), como “el cultivo de organismos acuáticos tanto en zonas costeras como del interior que implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción” (FAO, 2015). Es una fuente muy importante de productos acuáticos en todo el mundo, que ha ido evolucionando de manera rápida hasta convertirse en una fuerte actividad económica de producción de alimentos, materias primas de uso industrial y farmacéutico, así como de organismos vivos para repoblación u ornamentación que da empleo a más de 23 millones de personas en el mundo de forma directa y otros 6,5 millones indirectamente (FAO, 2015).

El cultivo de organismos acuáticos a pequeña escala ha existido desde tiempos antiguos en muchos países, pero el cultivo a gran escala es un suceso relativamente reciente, aproximadamente desde mediados del siglo XX cuando se inicia una pequeña evolución hasta la producción industrial que ahora existe.

Según los últimos datos publicados en el informe de la FAO sobre el *“Estado mundial de la acuicultura y la pesca en 2014”* la producción pesquera mundial, alcanzó un máximo histórico de 158 millones de toneladas en 2012, de las cuales 66,6 millones de toneladas correspondieron a la acuicultura. Unos 58 millones de personas trabajaron en el sector primario de la pesca de captura y la acuicultura en 2012, el empleo en este sector ha crecido más rápido que la población mundial (FAO, 2014).

El Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) señala que la acuicultura en España inició su desarrollo hace unos 50 años. Indica también que tiene un papel muy significativo en el desarrollo social y económico de determinadas zonas, y que incluso en algunas CCAA supera en importancia a la pesca extractiva. La producción acuícola se ha consolidado como una excelente opción para el suministro de un producto sano y seguro. En cuanto a cifras, expone que la obtención primaria de productos procedentes de la acuicultura, el marisqueo y la pesca, disminuyó en 2012 en un 14,52% hasta alcanzar las 1.081.881 Tm, una disminución acuícola del 2,75% respecto al año anterior (MAGRAMA, 2015). También destaca que de esta producción acuícola total, sólo el 6,31% correspondió en el año 2012 a acuicultura continental, el resto de la producción se dio en el ámbito de la acuicultura marina. Dentro de esta producción en aguas marinas, en España, las especies que se producen principalmente son moluscos bivalvos, destacando la producción del mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), con un 76% de la producción acuícola nacional.

En España, a lo que se refiere a la producción de peces, la lubina (*Dicentrarchus labrax*), la dorada (*Sparus aurata*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) son las principales especies de producción, seguidas por el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y la anguila (*Anguilla anguilla*). También se crían, aunque en menor cantidad, otras especies de interés comercial como el lenguado (*Solea solea*), el besugo (*Pagellus bogaraveo*) o la corvina (*Argyrosomus regius*), que colocan a nuestro país como uno de los que tienen una mayor diversificación de especies acuáticas de producción (APROMAR, 2014).

La producción de peces, tanto de acuicultura marina como continental, supone un 22% del total, lo que ha supuesto un espectacular crecimiento multiplicándose por dos en los ocho últimos años (MAGRAMA, 2015).

Según Bondad-Reantaso et al. (2005), el crecimiento de la acuicultura hasta niveles que puede llegar a considerarse una ganadería de agua dulce y salada, va ligado como consecuencia de esta intensificación, al incremento de manera exponencial en el número y gravedad de las enfermedades infecciosas, siendo éstas uno de los principales problemas sanitarios para el desarrollo de la acuicultura moderna, que debe ser subsanado para evitar las grandes pérdidas económicas que ocasionan al sector.

McVicar (1997), señala que las actividades acuáticas, pueden producir, directa o indirectamente, alteraciones en las condiciones ambientales, que a su vez pueden producir modificaciones en la microbiota bacteriana y las interrelaciones con el resto de organismos, pudiendo llegar a manifestarse como procesos patológicos de origen multifactorial.

Sumado a la modificación del medio ambiente y la presencia de algunos microorganismos patógenos, aparecen las características propias del hospedador, y las estrechas interacciones que se producen entre éste con el agente patógeno y el medio ambiente en el que se encuentra, pudiéndose romperse el equilibrio y favorecer por tanto, la presencia de patologías, especialmente aquellas de origen bacteriano (Hedrick et al., 1998).

Para hacer frente a los procesos patológicos que se presentan, los peces son tratados con diversos antimicrobianos, pero el mal uso o el uso continuado de los mismos ha propiciado la aparición de resistencias bacterianas, resultando dichos tratamientos en muchas ocasiones ineficaces, además de aumentar notablemente los costes de producción (Balcázar et al., 2006).

Una posible solución es la reducción del uso inapropiado de los antibióticos y la búsqueda de nuevas estrategias para el control y prevención de estas patologías que se presentan, qué

además puedan contribuir a mejorar los resultados productivos y qué eleven la resistencia de las poblaciones piscícolas.

Las enfermedades de origen bacteriano, son consideradas como un riesgo importante en la producción acuícola continental (Padrós y Furones, 2002), especialmente los procesos causados por bacterias Gram negativas. En la actualidad entre los procesos más relevantes en la producción salmonícola se encuentran el grupo de las flavobacterias o “myxobacterias”, integrados por bacterias de características muy heterogéneas que afectan principalmente a la piel, aletas y branquias, aunque en algunos casos pueden llegar a producir procesos septicémicos de carácter generalizado (Roberts, 2012; Loch y Faisal, 2015).

Dentro de este amplio abanico de procesos y agentes implicados, destacamos por su importancia en la patología de los peces teleósteos las siguientes especies, si bien prestaremos una atención especial a la última de ellas (*Flavobacterium psychropilum*) por las graves implicaciones económicas y sanitarias (mortalidad alta) que tienen en el cultivo de especies continentales de alto valor comercial:

Así: *Flavobacterium columnare*, causa la enfermedad de columnaris, *Flavobacterium branchiophilum*, agente causal de la enfermedad bacteriana de las branquias y, finalmente *Flavobacterium psychrophilum* que causa la enfermedad de aguas frías, también denominada síndrome del alevín cuando la especie afectada es la trucha arcoíris (Holt et al., 1993; Rangdale et al., 1996).

*Fl. psychrophilum* es una bacteria que produce una enfermedad altamente prevalente a nivel mundial, que causa grandes pérdidas económicas incluso a los piscicultores más experimentados y con mejores instalaciones. Esta bacteria ha sido aislada en la mayor parte de las especies de salmonídos y en otras especies en menor escala donde no se ha manifestado clínicamente la enfermedad (Amos 1985; Austin y Austin 1993; Dalsgaard 1993).

*Fl. psychrophilum* es un bacilo Gram negativo, de aspecto filamentoso (propiedad útil a la hora de identificarla mediante pruebas morfológicas y de microscopía), y movimiento deslizante que fue aislada por primera vez en 1948 (Borg, 1960).

Se definen como “microorganismos fastidiosos” debido a la complejidad que presentan en cuanto a los requerimientos nutricionales para su cultivo, así como en el tiempo de crecimiento que precisan ( $> 72$  horas), lo que dificulta enormemente su aislamiento y posterior identificación a partir de animales enfermos. En medio de cultivo sólido producen un pigmento de color amarillento muy característico (Bernardet et al., 1996; Elsayed et al., 2006); una de las características más importantes que presenta, es su capacidad para formar biofilms,

confiriéndole una gran resistencia en el medio, lo que dificulta su eliminación, así como una gran capacidad de adherencia tanto a los huevos, como al mucus de branquias y piel. Se ha observado una correlación directa entre la virulencia de las cepas bacterianas y esta capacidad de adhesión de las mismas (Nematollahi et al., 2003).

Desde un punto de vista epidemiológico, esta patología aparece normalmente a temperaturas por debajo de 16°C, aumentando significativamente su prevalencia y severidad de los daños por debajo de los 10°C (Clifford ES, 2011).

Las pérdidas más severas suelen ocurrir en peces entre 0.2 a 2 gramos de peso donde puede resultar una mortalidad acumulada de hasta 90%, esto puede deberse a la inmadurez de la respuesta inmune de los alevines (Crump et al., 2001; Crump et al., 2005).

Existen dos vías de transmisión de la enfermedad, horizontal (mediante el contacto entre peces enfermos y/o portadores de la bacteria y sanos, por la presencia de heridas, heces y aguas contaminadas) y la vía vertical (presencia de la bacteria en huevos y fluidos seminales). Estos mecanismos, son favorecidos por esa capacidad especial que tiene la bacteria de formar biofilms.

Los hallazgos clínicos más destacables son la melanosis generalizada de los peces, erosiones y ulceraciones cutáneas, necrosis de aletas y branquias, pudiendo en los casos más graves exhibir una descamación completa de la aleta caudal. En los ejemplares más jóvenes, pueden observarse signos nerviosos como natación errática y movimientos en espiral (Elsayed et al., 2006).

En aquellos peces que sobreviven a la infección, se pueden observar malformaciones producidas por la compresión de la aleta caudal (Madsen et al., 2001).

Aunque sin duda, el cuadro más característico presenta una septicemia generalizada, esplenomegalia, ascitis, sin exoftalmia y las heces en hilera.

A parte del diagnóstico clínico de esta enfermedad, debe realizarse un diagnóstico laboratorial para confirmar la presencia de la bacteria. Principalmente se basa en el aislamiento e identificación en medios específicos y enriquecidos como el Agar Cytophaga, Anackel-Ordal y Agar TYES, a una temperatura de incubación de 15°C, durante 72-96 horas. También se pueden realizar pruebas moleculares a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante el uso de cebadores específicos; en todos los casos, la mejor muestra para realizar dichas pruebas son el hígado, el riñón anterior y el bazo de los individuos (Del Cerro et al., 2002).

Conocidas las características que pueden desarrollar esta bacteria para sobrevivir, el tratamiento contra *Fl. psychrophilum* se basa en el uso de antibióticos de elección como la

amoxicilina, el florfenicol o la oxitetraciclina, administrados por vía oral junto con el pienso. Además, se pueden utilizar otros como sulfonamida(trimetoprim, doxiciclina o quinolonas (Ramsrud et al., 2007).

Cabe destacar, que el excesivo uso que se hace de estos compuestos en algunos casos está siendo cuestionado por los efectos ambientales y toxicológicos, así como por las resistencias que presentan los microorganismos por el uso continuado de los mismos (resistentes a las sulfamidas potenciadas entre otras), y la baja susceptibilidad a estas sustancias cuando la bacteria se encuentra formando biofilms. Por otra parte, la administración oral de estos terapéuticos no siempre es efectiva, siendo muy relevante la temperatura del agua a la que se encuentran (Crump et al., 2001).

La desinfección mediante baños con cloramina T o formalina es un método eficiente para controlar las bacterias presentes en la superficie de los huevos e incluso ayudan en el tratamiento de animales con lesiones epiteliales visibles (Lonnstrom et al., 2008).

La mayoría de los agentes terapéuticos usados son capaces de alterar la microbiota normal intestinal, cuyo papel principal es constituir una primera barrera frente a la entrada de agentes patógenos. Bajo estas circunstancias, la aplicación de relaciones antagónicas microbianas se presenta como un método alternativo de control eficiente de microorganismos patógenos a la vez qué mucho menos perjudicial para el medio ambiente. En acuicultura, el antagonismo bacteriano es la base para el desarrollo de probióticos que ya están siendo utilizados en el cultivo de peces (Balcázar et al., 2006; Merrifield et al., 2010).

Sin embargo, hasta el momento no existe un tratamiento probiótico comercial indicado para el control de *Fl. psychrophilum* y no se conoce qué efecto puede tener una bacteria antagonista sobre la formación de los biofilms. En este sentido, indicar qué en la actualidad *Pediococcus acidilactici* CNCM MA18/5 (BACTOCELL®), es el único microorganismo probiotico autorizado en Europa para su uso en acuicultura (Reglamento CE Nº 911/2009; Reglamento UE Nº 95/2013).

La composición de la flora bacteriana endógena de los animales acuáticos tiene una mayor influencia en el estado de salud del individuo que en los animales terrestres, por lo tanto, la manipulación de dicha microbiota mediante la administración de niveles adecuados de probióticos desempeña un papel importante en el mantenimiento de la salud de las poblaciones piscícolas.

La palabra probiótico proviene del latín *pro* (para, a favor de) y del griego *bios* (vida) (Zivkovic, 1999), utilizándose por primera vez para denominar a las sustancias producidas por algunos microorganismos capaces de favorecer el crecimiento de otros microorganismos (Lilley y Stillwell, 1965).

Si hubiera que fusionar todas las definiciones de probiótico que se han ido describiendo a lo largo de los años, se podría decir que un probiótico en el ámbito de aplicación de la acuicultura es un microorganismo vivo, muerto o un componente de una célula microbiana, el cual es administrado a través de la alimentación o por el agua, mejorando ya sea la resistencia a enfermedades, el estado de salud, el crecimiento, la utilización del alimento, la respuesta al estrés o el vigor en general del huésped al que se le suministra, lo cual es logrado en parte a través de la mejora del equilibrio microbiano interno o del equilibrio microbiano del entorno ambiental (Moriarty, 1998; Verschuere et al., 2000; Farzanfar, 2006).

Es importante destacar, que en acuicultura los efectos beneficiosos de los probióticos no se limitan al tracto gastrointestinal, sino que también pueden mejorar la calidad del agua modificando la comunidad microbiana del medio acuático incluyendo los sedimentos (Verschuere et al., 2000).

Una amplia investigación ha conseguido finalmente demostrar la eficacia del uso de probióticos para mejorar la resistencia a enfermedades y reducir la mortalidad de los salmónidos contra algunas de las principales enfermedades que afectan a la acuicultura, entre las que destacamos la Forunculosis, la Vibriosis, la Enfermedad de aguas frías, la Yersiniosis, la Pasterelosis o la Lactococosis (Balcázar et al., 2006; Merrifield et al., 2010; Pérez-Sánchez et al., 2014).

A raíz de numerosas investigaciones llevadas a cabo en el campo de la acuicultura se han propuesto una serie de criterios que se deben tener en cuenta para seleccionar cepas bacterianas con potencial efecto probiótico (Spanggaard et al., 2001; Balcázar et al., 2006; Farzanfar, 2006; Vine et al., 2006; Gómez y Balcázar, 2008).

Algunas de estas características son: no debe ser patógeno, no sólo al huésped, sino con respecto a los animales acuáticos ni a los consumidores finales, debe estar libre de genes de resistencia a antibióticos, capaz de ser resistentes a las sales biliares y a bajos pH, capaz de colonizar la superficie epitelial intestinal y de adherirse y/o crecer bien en el mucus intestinal, la capacidad de producir sustancias antimicrobianas, la capacidad para modular la respuesta inmune en el hospedador, la competición con los agentes patógenos por los sitios de adhesión,

debe exhibir propiedades antagonistas hacia uno o más patógenos (en el caso de los salmonídos podría centrarse en *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Yersinia ruckeri*).

Uno de los criterios que más se está utilizando en la selección de probióticos es la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas realizando pruebas *in vitro*, en las que las bacterias candidatas se enfrentan a la bacteria patógena y tras un tiempo de incubación, se deben interpretar si ha mostrado o no inhibición de la bacteria patógena; Es importante remarcar que el efecto obtenido en estas pruebas debe ser interpretado con cierta precaución, ya que este resultado en algunas ocasiones no es el mismo que se obtiene en condiciones *in vivo* (Gram et al., 2001).

El modo de acción que resulta en los beneficios observados es difícil de cuantificar de manera concluyente, debido a la amplia gama de mecanismos de actuación de los mismos así como las complicadas relaciones multifactoriales de sinergismos que existen entre las distintas cepas probióticas. Gran parte de los mecanismos de acción y los efectos beneficiosos de los probióticos derivan de los estudios en humanos; sin embargo, los mecanismos de acción más destacables de los probióticos en los peces son: la producción de compuestos inhibitorios frente a la bacteria patógena (mecanismo de exclusión competitiva), la competencia por nutrientes o energía disponible, la competencia por los sitios de adhesión, la inhibición de la expresión de genes de virulencia, la mejora de la calidad del agua, la mejora de la respuesta inmune en el hospedador y la ayuda a la digestión enzimática (Sugita et al., 1996; 1997; 1998). Sin embargo, los mecanismos de inhibición bacteriana frente *Fl. psychrophilum*, no han sido descritos previamente (Ström-Bestor y Wiklund, 2011).

Aunque no siempre se conoce íntegramente el mecanismo de acción por el cual las bacterias probióticas causan un efecto beneficioso en el hospedador, en los salmonídos estos efectos suelen presentarse como un buen estado de salud, un incremento en la resistencia ante enfermedades, un incremento en el crecimiento, una mayor utilización del alimento, una mejora en la composición de la canal, la disminución de malformaciones, etc. (Farzanfar, 2006).

La exclusión competitiva consiste en impedir que una bacteria patógena colonice el tracto digestivo del organismo hospedador gracias a las bacterias presentes en el mismo (Lara-Flores y Aguirre-Guzmán, 2009). Se trata del mecanismo de acción probiótica más esperanzador ya que involucra una gran cantidad de procesos y factores que son esenciales en la dinámica microbiana (Smith, 1993).

Uno de los principales mecanismos que destacan en la exclusión competitiva, es la producción de sustancias inhibitorias. Este fenómeno fue observado por primera vez por De Giaxa (1889), al constatar el efecto inhibitorio producido por bacterias de origen marino sobre el crecimiento de *Vibrio* spp. (Pérez-Sánchez et al., 2014).

En el tracto digestivo, la microbiota endógena constituye una barrera frente a la proliferación de agentes patógenos debido en gran parte a la producción de estas sustancias inhibitorias que pueden actuar de forma independiente o combinada (Pérez-Sánchez et al., 2011).

Para llegar a ser más competitivo, los patógenos necesitan evolucionar y tener nuevas funciones. Cuando las bacterias de la microbiota endógena inhiben el crecimiento de agentes patógenos gracias a la secreción de un solo agente antimicrobiano, el patógeno necesita solamente adquirir un gen de resistencia específica a este antimicrobiano (Moriarty, 1998), mientras que, si existe un mecanismo de exclusión competitiva con interacción entre bacterias y sustancias antimicrobianas, el patógeno necesita modificar más de un gen de resistencia, siendo este mecanismo de adaptación más lento que con un solo plásmido de transferencia (Sørum, 2006).

En acuicultura, las interacciones que se establecen entre la microbiota y las bacterias patógenas no se limita al tracto gastrointestinal, sino que también están presentes en las branquias, en la piel y en el propio medio acuático (Tinh et al., 2008). Por lo tanto, es fundamental que el equilibrio entre la microbiota del hospedador y las bacterias patógenas se vea inalterado en la manera de lo posible.

A pesar de la gran cantidad de estudios sobre probióticos que han evaluado parámetros inmunológicos y hematológicos (Iranto y Austin, 2002; Nikoskelainen et al., 2003; Raida et al., 2003; Panigrahi et al., 2004; 2005; Balcázar et al., 2006; Kim y Austin, 2006; Brunt et al., 2007; Arijo et al., 2008; Pérez-Sánchez et al., 2011), los efectos inmunomoduladores de los probióticos en los peces en la actualidad son poco conocidos.

El sistema inmune de los peces puede ser estimulado por la presencia de cepas probióticas, ya que presentan compuestos en sus pareces celulares del tipo de los lipopolisacáridos, peptidoglucanos y  $\beta$ -glucanos, que mantienen en alerta los mecanismos de defensa del hospedador (Nayak, 2010).

La modulación de la respuesta inmune por parte de los probióticos se ha traducido en una gran variedad de efectos, entre los que destacan: la producción de citoquinas pro-

inflamatorias, la estimulación de las células NK, el incremento en la producción de anticuerpos y/o la actividad lisozima, la actividad complemento y/o fagocítica (Harikrishan et al., 2010; Pérez-Sánchez et al., 2011). De hecho, las propiedades inmunoestimuladoras de los probióticos han sido consideradas como el principal mecanismo de acción para proteger a los peces de las infecciones bacterianas (Sharifuzzaman y Austin, 2010).

Los probióticos también son capaces de estimular la producción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias, mediadores de naturaleza proteica producidos por células inmunitarias que contribuyen al crecimiento y diferenciación celular de los mecanismos de defensa del hospedador (Nayak, 2010; Pérez-Sánchez et al., 2011).

Así se ha observado que *Carnobacterium* spp. es capaz de aumentar la respuesta inmune innata en la trucha arcoíris frente patógenos como *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri* aumentando la actividad fagocítica, así como la actividad de la mucosa intestinal mediante la producción de una mayor cantidad de lisozima (Kim y Austin, 2006).

Balcázar et al. (2007) administraron cepas con potencial efecto probiótico, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sakei* y *Leuconostoc mesenteroides* a trucha arcoíris durante dos semanas a una concentración de 106 UFC/g<sup>-1</sup>. En comparación con el grupo control, la actividad fagocítica de los leucocitos HK y la actividad del complemento en suero fueron mayores en los grupos de peces alimentados con probióticos. En el caso de *L. sakei*, la producción del anión superóxido también se incrementó significativamente, sin embargo, no se detectó ningún efecto sobre la actividad de la lisozima.

Con respecto a los efectos probióticos en el sistema inmune adaptativo, Arijo et al. (2008) demostraron que la administración de cepas probióticas resultaron en la expresión de anticuerpos de reacción cruzada que eran específicos para proteínas de la membrana externa y productos celulares de patógenos bacterianos, los cuales confieren un efecto protector frente al ensayo que se realizó con *Vibrio harveyi*. Además, estos mismos autores también demostraron que la dieta suplementada con probióticos (*Aeromonas sobria*, cepa GC2) inducía protección en la trucha arcoíris contra las infecciones de la piel causadas por *Aeromonas bestiarum*. Dicha protección surgió como consecuencia del aumento de la respuesta fagocítica.

Además de los efectos directos, los efectos indirectos de los probióticos pueden conferir beneficios para la salud del animal. Productos de fermentación tales como ácidos grasos de cadena corta (butirato), son capaces de modular las funciones de barrera ante agentes

patógenos y regular los procesos inflamatorios, debido a la disminución de la permeabilidad epitelial a través de la regulación de las uniones de las proteínas y la supresión de citoquinas pro-inflamatorias. Estos ácidos grasos de cadena corta actúan como reguladores en ambos mecanismos inmunitarios, tanto adaptativos como innatos (van Nuenen et al., 2005).

En los últimos años, numerosos autores han sugerido que la microbiota intestinal de los peces puede desempeñar un papel importante como barrera defensiva contra las infecciones entéricas (Birkbeck TH y Ringø, 2005; Ringø et al., 2005; Gómez y Balcázar, 2008).

La mayor parte de las bacterias utilizadas como probióticos en la acuicultura son agentes Gram positivos, especialmente bacterias ácido lácticas (BAL), pertenecientes una gran parte a los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium* y *Bacillus* (Balcázar et al., 2006).

Las BAL son un grupo de bacterias, capaces de producir ácido láctico como principal producto final de la fermentación de los carbohidratos. Dichas bacterias han demostrado ser eficaces para el control de algunas enfermedades como la Edwardisellosis, la Forunculosis y las Vibriosis (Chang y Liu, 2002; Iranto y Austin, 2002; Harikrishnan et al., 2010).

La aplicación continua de estas bacterias, y algunas Gram negativas en los salmonídos, puede conducir a altos niveles de colonización de las mismas y llegar a modular la población microbiana del tracto gastrointestinal (Panigrahi et al., 2004, 2005; Aubin et al., 2005; Balcázar et al., 2007; Bagheri et al., 2008).

Algunos autores como Balcázar et al. (2007) y Vendrell et al. (2008), observaron que *Leuconostoc mesenteroides* era capaz de conferir protección en truchas arcoíris frente a *A. salmonicida* y *L. garvieae* respectivamente. La competición por los nutrientes y los sitios de adhesión podría ser el principal mecanismo de acción de esta cepa probiótica, puesto que los análisis moleculares realizados posteriormente demostraron su presencia en el intestino del hospedador (Pérez-Sánchez et al., 2014).

Los géneros más comunes de bacterias Gram negativas para su uso como potenciales probióticos en acuicultura son *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Vibrio* (Nayak, 2010).

La administración por baño de *Pseudomonas fluorescens* AH2 durante un período de 5 días redujo la mortalidad del 47 al 32% en truchas arco iris infectadas experimentalmente con *Vibrio anguillarum* (Gram et al., 1999).

Una amplia gama de probiontes se ha aislado del tracto digestivo de los salmonidos después de alimentarlos con dietas suplementadas; estos probióticos son entre otros *Aeromonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Carnobacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *P. acidilactici*, *Saccharomyces spp.* y *Vibrio spp.* (Merrifield et al., 2010).

Iranto y Austin (2002) demostraron la efectividad de *A. hydrophila* y *Vibrio fluvialis* en el control de infecciones causadas por *A. salmonicida* en explotaciones de trucha arcoíris. Por otro lado, *Pseudomonas* sp. MSB1 fue capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Fl. psychrophilum*, sugiriendo su papel como potencial probiótico en acuicultura, si bien sería necesario llevar a cabo estudios adicionales *in vivo* (Störm-Bestor y Wiklund, 2011).

En la investigación llevada a cabo por Boutin et al., (2012), obtuvieron siete cepas candidatas a ser probióticos frente *Fl. psychrophilum* mediante técnicas *in vitro*, cumpliendo una serie de requisitos exigidos para ello (aislados del mismo mucus de la piel de los ejemplares, ejercen efectos antagonistas frente a la bacteria patógena, etc). La adición de los probióticos en tanques de agua redujo significativamente la mortalidad de los peces infectados, lo que indicó una concordancia entre el experimento *in vitro* con los experimentos *in vivo* llevados a cabo. Sin embargo, solo testaron el efecto *in vivo* contra *Fl. columnare* ya que la infección se produjo de forma natural después de un estrés debido a la manipulación y no a un desafío contra el propio patógeno (*Fl. psychrophilum*). A pesar de todo ello, no fueron capaces de identificar claramente los mecanismos implicados en el fenómeno de exclusión competitiva.

Todo esto hace que la investigación y posteriormente el uso de probióticos sea una de las alternativas que cobre más fuerza frente a los tratamientos convencionales, ya que se ha observado que la administración de los mismos de forma regular es capaz de inhibir la proliferación de agentes patógenos mediante la activación de unos mecanismos presentes en el hospedador que favorecen fenómenos de exclusión competitiva, un incremento de la respuesta inmunitaria, así como la producción de sustancias antibacterianas.

Por todo lo expuesto, se planteó un estudio preliminar con el fin de seleccionar la presencia de cepas bacterianas obtenidas de la microbiota endógena con potencial efecto probiótico frente al agente etiológico *Fl. psychrophilum*.

### **III. OBJETIVOS**

El objetivo principal del presente trabajo fue aislar y seleccionar cepas bacterianas procedentes de la microbiota endógena de los peces con potencial efecto probiótico frente al agente patógeno *Fl. psychrophilum*.

Para ello se marcaron los siguientes objetivos específicos:

1. Aislar e identificar fenotípicamente aquellas cepas bacterianas con potencial efecto probiótico obtenidas a partir de brotes naturales de enfermedad.
2. Caracterizar preliminarmente las cepas aisladas mediante pruebas de inhibición in vitro frente a *Fl. psychrophilum* y/o resistencia a diferentes condiciones de pH y sales biliares.

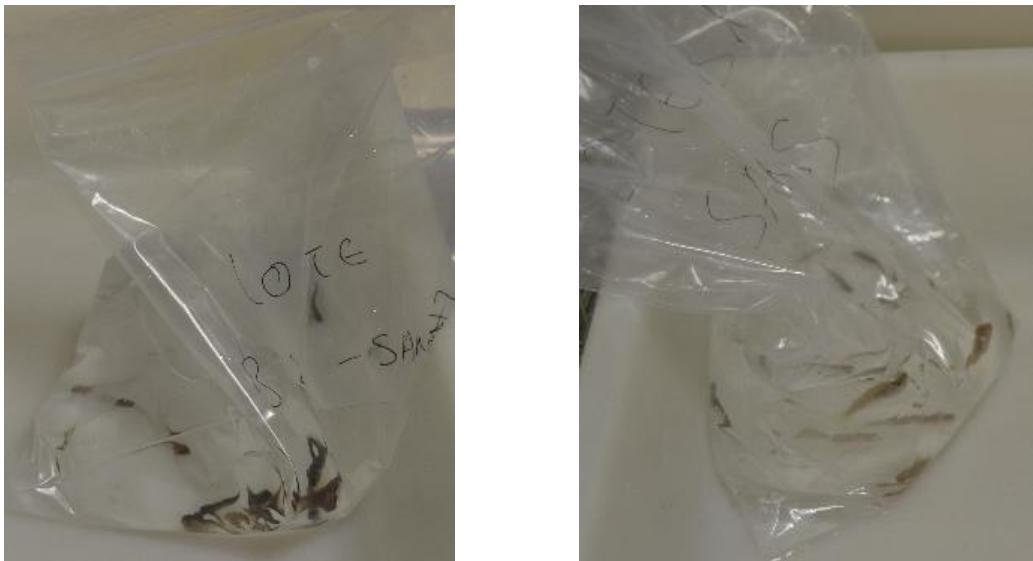
### **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **IV.1. Recepción de peces**

Para la realización de los diferentes estudios que se describen en este trabajo, se utilizaron ejemplares de trucha arcoíris y trucha común (*Salmo trutta*) en fase de alevín procedentes de varias piscifactorías ubicadas en las Comunidades Autónomas de Aragón y La Rioja, sobre los que se sospechaba la presencia de la enfermedad de aguas frías, también denominada síndrome del alevín.

Al mismo tiempo, se realizaron estudios de los brotes de enfermedad.

Dichos ejemplares, llegaron distribuidos en diferentes lotes al Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza en un intervalo de tiempo muy corto desde su captura (menos de 24 horas), correctamente embalados, etiquetados y a temperaturas de refrigeración (4-6°C) para asegurar la supervivencia hasta su recepción.



**Figuras 1 y 2.** Lotes de peces que llegaron al laboratorio.

Los lotes remitidos, contenían en su mayoría ejemplares vivos, pero también llegaron animales muertos debido a la gravedad de la enfermedad y el estrés producido por el viaje.

Una vez en el laboratorio, y previo a la necropsia y posterior toma de muestras para análisis bacteriológico y molecular, los peces fueron sacrificados, mediante la sobredosificación anestésica con aceite de clavo (250 ppm). Para la toma de muestras se realizó una selección e inspección de los peces.

#### **IV.2. Diagnóstico/Análisis microbiológico**

Para el aislamiento de *Fl. psychrophilum*, se utilizaron varios medios de cultivo sólidos y enriquecidos,-agar TYES, agar FLP (Hipra, España) y agar Tripticasa Soja (TSA; Scharlau, España)-, a partir de siembras realizadas del mucus cutáneo y de los órganos internos (intestino, hígado, bazo y riñón anterior). La temperatura de incubación fue de 15°C durante 72-96 horas.

La confirmación de las cepas de *Fl. psychrophilum* aisladas se realizó por métodos moleculares (*Real-Time qPCR*).

Del mismo modo, se realizó el aislamiento de las cepas bacterianas procedentes de la microflora endógena de los peces aparentemente sanos, en diferentes medios de cultivo como el agar TYES, agar TSA y el agar MRS (Scharlau, España), y en este caso, a una temperatura de incubación de 22°C durante 48-72 horas.

En cuanto a la identificación fenotípica de las cepas candidatas, una vez aisladas, se llevó a cabo mediante una serie de pruebas morfológicas de tinción específicas (tinción de Gram) y microscopía, así como una serie de pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa, oxidación-fermentación, valoración de la movilidad, TSI (valoración de la fermentación de la glucosa, lactosa y sacarosa, además de la producción de H<sub>2</sub>S), Citrato de Simons, Esculina y Urea/Indol. Además, se incluyeron sistemas de identificación rápida API 20NE y API 20Strep (bioMérieux) en algunas de las cepas que así lo requerían.

Las cepas candidatas que presentaron propiedades antibacterianas se remitieron al Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional de la Universidad de Zaragoza para su secuenciación.

#### **IV.3. Selección de cepas candidatas con propiedades antibacterianas (Pruebas de Inhibición)**

Para la selección de agentes bacterianos con propiedades antibacterianas se utilizó el método descrito por Nikoskelainen et al., (2001) y Ström-Bestor y Wiklund (2011).

Para ello se partió de las cepas aisladas previamente a partir de los peces aparentemente sanos de cada uno de los casos descritos con anterioridad.

Las diferentes cepas de *Fl. psychrophilum* fueron sembradas en agar TYES utilizando posteriormente 100 µL de la suspensión bacteriana a una concentración de 10<sup>7</sup> UFC/mL. Posteriormente, se depositaron pequeñas cantidades de cultivo fresco procedentes de aquellas cepas que se pretendían estudiar. La temperatura de incubación fue de 18°C durante 5-6 días.



**Figura 3.** Placa de agar TYES sembrada mediante la técnica del acúmulo bacteriano.

#### **IV.4. Caracterización de las cepas candidatas seleccionadas con efecto inhibitorio frente a *Fl. psychrophilum***

Una vez seleccionadas las cepas candidatas que mostraron efecto inhibitorio frente a las distintas cepas de *Fl. psychrophilum* aisladas a partir de los brotes de enfermedad estudiados, se procedió a realizar dos pruebas para realizar una caracterización preliminar de las mismas según los métodos descritos por Pérez-Sánchez et al., (2011): tolerancia a distintas concentraciones de sales biliares y a determinadas condiciones de pH.

Para determinar la resistencia a las sales biliares los cultivos se sembraron por duplicado en agar MRS adicionados con 0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8% y un 1,0% de sales biliares (Oxoid, España); y se incubaron durante 48 h a una temperatura de 22°C. Estas siembras por duplicado se hicieron de las diluciones  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  y  $10^1$  UFC/mL, respectivamente, con el objetivo de realizar conteos bacterianos en las distintas placas.

Por otra parte, las bacterias candidatas, fueron también llevadas hasta una suspensión de una concentración de  $10^7$  UFC/mL, para centrifugar 5 tubos de la bacteria con una concentración de  $10^6$  UFC/mL, eliminar el sobrenadante, y añadir 4,5 mL de una solución tamponada, previamente ajustada con HCL a valores de pH de 1.0, 2.0, 3.0, 7.4 y 8.0, respectivamente. Las suspensiones se incubaron durante 3 horas a una temperatura de 22°C. Tras la incubación, se realizaron diluciones seriadas de todas las suspensiones con distintos pH, para realizar siembras en placas de TYES de cada pH con concentraciones de la bacteria de  $10^1$ ,  $10^2$  y  $10^3$  con asa de Driglasky. Las siembras de todas y cada una de las suspensiones se hicieron por duplicado. La lectura se hizo pasado un tiempo de incubación de 48 h a una temperatura de 22°C.

### **V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Durante el periodo de estudio se registraron 5 brotes de Enfermedad de aguas Frías, en explotaciones localizadas en la Comunidad Autónoma de Aragón y la Comunidad Autónoma de La Rioja, respectivamente (Tabla 1).

En la recepción de los diferentes lotes de peces enfermos que llegaron al laboratorio, se pudo observar ejemplares vivos y muertos. La mayoría de los alevines, presentaban oscurecimiento de la piel, algunas erosiones en la misma, y un hallazgo muy característico, el enrojecimiento generalizado de las branquias de los peces.

Esta sintomatología concuerda con la descripción que describen Madsen et al., (2001), Elsayed et al., (2006) y Robers (2012), incluso en algunos de los ejemplares se pudo observar signos nerviosos como bien describen en sus artículos (natación errática y movimientos en espiral).

El conjunto de síntomas observados concuerdan con los resultados obtenidos en las pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares (en las cuales se aisló e identificó *Fl. psychrophilum*) en todos los brotes analizados.



**Figura 4.** Alevines de los casos estudiados con hemorragias branquiales.

En todos los brotes, se diagnosticó como agente etiológico responsable de la enfermedad *Fl. psychrophilum*. La especie piscícola afectada fue la trucha común.

Además del aislamiento de *Fl. psychrophilum* en los peces enfermos, se aislaron en los peces sanos un total de 34 cepas bacterianas procedentes de la micro flora endógena de los peces analizados procedentes de la totalidad de los brotes estudiados (Tabla 1).

**Tabla 1.** Brotes de flavobacteriosis registrados a lo largo del periodo de estudio.

ORIGEN (FECHA)	ESPECIE	AG. PATÓGENO	REF. LABORATORIO	Nº CEPAS AISLADAS
<b>La Rioja (27/02)</b>	Trucha común	<i>Fl. psychrophilum</i>	Caso 2/15	12
<b>La Rioja (13/04)</b>	Trucha común	<i>Fl. psychrophilum</i>	Caso 4/15	6
<b>Aragón (16/04)</b>	Trucha común	<i>Fl. psychrophilum</i>	Caso 6/15	8
<b>Aragón (22/04)</b>	Trucha común	<i>Fl. psychrophilum</i>	Caso 7/15	6
<b>Aragón (23/04)</b>	Trucha común	<i>Fl. psychrophilum</i>	Caso 9/15	2

A partir de las mismas, se aislaron un total de 22 cepas que fueron capaces de producir halos de inhibición en las pruebas *in vitro* realizadas, de todos los brotes estudiados (Tabla 2). Todas ellas forman parte de la microflora endógena de los peces, además de ser saprófitos del medio ambiente, aunque algunas de estas cepas, en determinadas condiciones pueden comportarse como agentes patógenos secundarios, como por ejemplo *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* (Austin y Austin, 1993; Robers, 2012).

Para ello, se consideró que un halo de inhibición mayor o igual a 3 mm de diámetro producido por una bacteria, ésta presentaba propiedades inhibitorias, en base a distintas publicaciones (Balcázar et al., 2006).

Estas cepas representan el 1-2% de la microbiota total presente en el mucus cutáneo de los salmónidos (Boutin et al., unpublished).

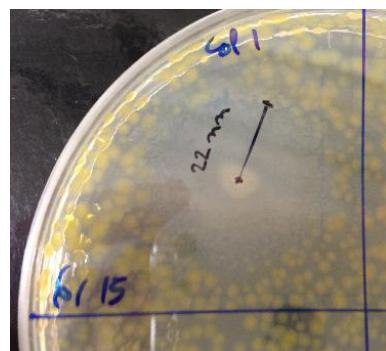
Se decidió seleccionar tres cepas bacterianas para continuar con la caracterización de estas tres cepas candidatas con carácter inhibitorio frente a *Fl. psychrophilum*. Dichas colonias fueron la cepa 5 *A. hydrophila*, la cepa 7 *Ps. fluorescens* y la cepa 10 *Ps. putida*, todas ellas procedentes del caso 2/15 (Tabla 2).

La selección de estas tres cepas y no otras se realizó en base a los resultados obtenidos en función del potencial inhibitorio que mostraron en las pruebas laboratoriales *in vitro*. Esas tres cepas, forman parte de la microflora endógena de los peces, y se comportan como organismos saprófitos, pero ninguna de las tres son bacterias ácido lácticas (BAL). Los resultados obtenidos por otros autores en estudios similares mostraron un mayor aislamiento de BAL (bacterias consideradas generalmente como seguras por la Organización Mundial de la Salud). Existen estudios previos en los que se ha demostrado que algunas BAL tienen la capacidad de sintetizar bacteriocinas (Balcázar et al., 2006, Pérez-Sánchez et al., 2011). Pero en nuestros casos, no fueron aisladas de la microflora endógena (salvo una colonia, *Lactococcus lactis lactis*, la cual no produjo halo inhibitorio).

Boutin et al., (2012), en un estudio de cepas antagónicas frente *Fl. columnare* y *Fl. psychrophilum*, obtuvieron un total de 7 cepas bacterianas con efecto inhibitorio frente a estas dos bacterias.

**Tabla 2.** Identificación de las colonias de la flora comensal que mostraron halo de inhibición.

REF. LABORATORIO	REF. CEPA	IDENTIFICACIÓN
CASO 2/15	COL 1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
CASO 2/15	COL 2	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
CASO 2/15	COL 3	<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>
CASO 2/15	COL 4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
CASO 2/15	COL 5	<i>Aeromonas hydrophila</i>
CASO 2/15	COL 6	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
CASO 2/15	COL 7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
CASO 2/15	COL 9	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
CASO 2/15	COL 10	<i>Pseudomonas putida</i>
CASO 4/15	COL 1	<i>Bacillus spp</i>
CASO 4/15	COL 2	<i>Streptococcus constellatus</i>
CASO 4/15	COL 4	<i>Aerococcus viridans</i>
CASO 4/15	COL 6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
CASO 4/15	COL 7	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
CASO 4/15	COL 10	<i>Ps. fluorescens</i>
CASO 6/15	COL 1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
CASO 7/15	COL 1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
CASO 7/15	COL 4	<i>Aerococcus viridans</i>
CASO 7/15	COL 6	<i>Chryseomonas luteola</i>
CASO 7/15	COL 8	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
CASO 9/15	COL 1	<i>Pseudomonas maltophilia</i>
CASO 9/15	COL 3	<i>Pseudomonas putida</i>



**Figura 5.** *Sphingomonas paucimobilis*, cepa productora de halo inhibitorio.

Los resultados de las pruebas de inhibición muestran que el mecanismo implicado en el efecto antagonista contra la bacteria patógena fue una exclusión competitiva o la síntesis de antimicrobianos frente a la misma.

Este concepto de la exclusión competitiva ejercido por los probióticos contra patógenos fue descrito en las especies piscícolas, crustáceos y otros organismos acuáticos por Balcázar et al., (2004). La exclusión competitiva es el modo de acción de los probióticos más esperanzador porque implica muchos procesos y factores que son esenciales en la dinámica microbiana (Smith, 1993).

Con las tres cepas candidatas seleccionadas, se llevaron a cabo una serie de pruebas con el fin de establecer el grado de supervivencia que presentaban éstas a diferentes condiciones de pH y sales biliares.

En una primera parte, con unas suspensiones bacterianas de concentración  $10^5$  y  $10^4$ , obtuvimos unos resultados tras la incubación y exposición a las diferentes concentraciones de sales biliares que eran incontables en placa debido a su crecimiento, por lo que se decidió repetir el ensayo pero esta vez con suspensiones bacterianas de menor concentración, exactamente  $10^3$ ,  $10^2$  y  $10^1$ , para así tratar de obtener resultados que fuesen posible su lectura (Anexo I, tabla 3; Anexo I, tabla 4; Anexo I, tabla 5).

En las pruebas realizadas, todas las cepas probióticas candidatas mostraron una tolerancia relativa a diferentes condiciones de sales biliares. Todas las cepas lograron sobrevivir altas concentraciones de sales biliares. Aunque en humanos si, la concentración fisiológica de bilis en los peces no ha sido establecida por el momento.

Las mismas cepas candidatas fueron enfrentadas a una serie de pH también conocidos (Anexo I, tabla 6; Anexo I, tabla 7; Anexo I, tabla 8).

Todas las cepas probióticas candidatas mostraron una tolerancia relativa a diferentes condiciones de pH. Se observó un mayor porcentaje de supervivencia frente a valores de pH entre 7.4-8. Sin embargo, valores de pH inferiores a 3.0 inhibieron el crecimiento de todas las cepas candidatas estudiadas, salvo *Pseudomas putida*, que los recuentos a pH 3 fueron muy superiores en comparación a las otras dos cepas estudiadas (Anexo I, tabla 7).

Sin embargo, el pH más básico al que fueron sometidas las colonias en este ensayo (pH 8), produjo una disminución en los recuentos bacterianos en comparación con el pH de 7.4 salvo en el caso de *Pseudomonas fluorescens*, que fue al contrario (Anexo I, tabla 8).

En base a estos resultados, las tres cepas bacterianas cumplen varios criterios para en un futuro, poder realizar un experimento *in vivo* de validación de los resultados obtenidos *in vitro*. En primer lugar, las tres cepas fueron aisladas del mucus de la piel de los propios peces. En segundo lugar, las cepas fueron capaces de adherirse y colonizar el mucus. En tercer lugar, todas ellas ejercieron efectos antagonistas contra *Fl. psychrophilum* por exclusión competitiva de nutrientes y/o síntesis de compuestos antimicrobianos (Verschueren et al., 2000). Además, toleraron las diferentes concentraciones de sales biliares y las bajas condiciones de pH relativamente.

Por todo ello, y pudiendo realizar en un futuro diferentes pruebas de caracterización de las cepas bacterianas seleccionadas, *A.hydrophila*, *Ps. fluorescens* y *Ps. putida*, pueden ser consideradas en posteriores investigaciones durante el proceso de selección de cepas probióticas.

## **VI. CONCLUSIONES**

1. La caracterización fenotípica ha puesto de manifiesto el aislamiento mayoritario de bacterias que tienen su origen en la microflora pez.
2. De todas cepas aisladas sólo *A.hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* han presentado un efecto inhibitorio suficiente frente a *Flavobacterium psychrophilum* para ser considerarlas como bacterias candidatas.
3. La utilización de cepas con potencial efecto probiótico aisladas en este trabajo podrían constituir una alternativa eficaz para la prevención de la enfermedad de aguas frías si bien es necesario completar todavía el protocolo de selección de las mismas.

## **CONCLUSIONS**

1. Phenotypic characterization has revealed the majority isolation of bacteria originating in fish microflora.
2. Of all bacteria isolates only *A.hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* have presented a sufficient inhibitory effect against *Flavobacterium psychrophilum* to be consider as candidates bacteria.
3. The use of bacteria with probiotic potential effect isolated in this work could be an effective alternative for preventing the disease cold water while it is still necessary to complete the protocol for selecting them.

## **VII. VALORACIÓN PERSONAL**

Esta última asignatura de la titulación en forma de trabajo ha supuesto una fuente de aprendizaje y evolución como estudiante y como futuro profesional de la veterinaria.

En primer lugar, la propuesta de este trabajo del director experto en la acuicultura me ha brindado la oportunidad de profundizar en el conocimiento de profundamente una de las

enfermedades más importantes que aparecen en la producción de especies salmonícolas de este país, la Enfermedad de Aguas Frías. En cuanto a este nivel de conocimiento de la misma, cabe destacar la mejoría en mis habilidades para la gestión de la información tras este trabajo. También he conocido nuevas fuentes de búsqueda para trabajos científicos y de investigación, pudiendo ser de utilidad en futuros trabajos.

En segundo lugar, el trabajo que he desempeñado junto a una técnico de laboratorio. He aprendido a preparar diferentes medios de cultivo, nuevas técnicas de siembra de bacterias que hasta entonces me eran desconocidas, el manejo y la configuración de aparatos como el autoclave, espectrofotómetro, balanzas de precisión, etc.; que hasta entonces desconocía.

También he aprendido a conservar cepas bacterianas mediante la congelación, realizar aislamientos bacterianos, tomar muestras de los casos de enfermedad que llegaban al laboratorio, analizar las diferentes sintomatologías de los lotes que llegaron, realizar y conocer el fundamento de las diferentes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares para la identificación bacteriana, conocer y poner en marcha pruebas *in vitro* de inhibición bacteriana, etc.

Al mismo tiempo, una experiencia muy enriquecedora para mi persona ha sido el compartir el trabajo diario con una persona en el laboratorio de forma continua, y esporádicamente con el diferente personal del departamento de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

Tercero, aprender a referenciar las citas bibliográficas que he tenido que usar en este presente trabajo de forma correcta, así como sus posteriores referencias bibliográficas en el apartado de bibliografía, tanto de libros, páginas web, artículos científicos o tesis doctorales.

Cuarto, mejorar la lectura y comprensión de artículos científicos en inglés, así como la expresión escrita en el mismo idioma.

Por último, y no por ello menos importante, considero que este trabajo ha sido una experiencia muy enriquecedora para terminar con los cinco años de carrera, conociendo de primera mano una de las muchas opciones laborales que brinda la Veterinaria, el trabajo de investigación. Después de varios meses realizando pruebas, eligiendo medios de cultivo y técnicas para obtener los mejores resultados, afortunadamente obtuvimos resultados en el trabajo al seleccionar tres cepas que fueron potencialmente productoras de halos de inhibición frente al patógeno productor de la enfermedad.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chrisholm SW, Devereux R, Stahl DA. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990; 56: 1919-1925.
- Amos K. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. 3<sup>a</sup> Edit. Fish Health Section, American Fishery Society, Corvallis. Oregon. 1985.
- APROMAR (Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos en España). *La Acuicultura en España*. 2014.
- Arijo S, Brunt J, Chabrilón M, Díaz-Rosales P, Austin B. Subcellular components of *Vibrio harveyi* and probiotics induce immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum) against *V.harveyi*. *Journal of Fish Diseases*. 2008; 31: 579-590.
- Aubin J, Gatesoupe FJ, Labbe L, Lebrun L. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum). *Aquaculture*. 2005; 36: 758-767.
- Austin B, Austin DA. Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. 2<sup>a</sup> Edit. Ellis Horwood Ltd. Chichester.UK. 1993.
- Bagheri T, Hedayati SA, Yavari V, Alizade M, Farzanfar A. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Journal Fish Aquatic*. 2008; 8: 43-48.
- Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D, Múzquiz JL. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*. 2006; 114: 173-186.
- Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vandrell D, Gironés O, Muzquiz JL. Change in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in Brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition*. 2007; 97: 552-552.
- Bernardet JF, Baudin-Laurencin F, Tixeran G. First identification of *Cytophaga psychrophila* in France. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathology*. 1988; 8: 104-105.
- Bernardet JF, Grimont PAD. Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev. and *Flexibacter maritimus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1989; 39: 346-354.
- Bernardet JF, Segers P, Vancanneyt M, Berthe F, Kersters K, Vandamme P. Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. Nov.

- (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tail 1987). *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1996; 46: 128-148.
- Birkbeck TH, Ringø E. Pathogenesis and the gastrointestinal tract of growing fish. *Microbial Ecology in Growing Animal*. Elsevier. Edinburgh. 2005.
- Bondad-Reantaso M, Subasinghe RP, Arthur JR, Ogawa K, Chinabut S, Adlard R, Tan Z, Shariff M. Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*. 2005; 132: 249–272.
- Borg, AF. Studies on myxobacteria associated with diseases in salmonid fishes. American Association for the Advancement of Scienc. *Wildlife Disease*. 1960; 8: 1-85.
- Boutin S, Bernatchez L, Audet C, Derôme N. Antagonistic effect of indigenous skin bacteria of brook charr (*Salvelinus fontinalis*) against *Flavobacterium columnare* and *Flavobacterium psychrophilum*. *Veterinary Microbiology*. 2012; 155: 355-361.
- Brunt J, Newaj-Fyzul A, Austin B. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish Diseases*. 2007; 30: 573-579).
- Chang CI, Liu WY. An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguila anguilla* L. *Journal of Fish Diseases*. 2002; 25: 311-315.
- Chiok KL. Patogenicidad y Tipificación de *Flavobacterium psychrophilum* en Trucha Arcoiris. 2011.
- Clifford ES. Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. 2011.
- Crump EM, Perry MB, Clouthier SC, Kay WW. Antigenic Characterization of the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and environmental microbiology*. 2001; 67(2): 750–759.
- Crump EM, Burian J, Allen PD, Kay WW. Identification and expression of a host-recognized antigen, FspA, from *Flavobacterium psychrophilum*. *Microbiology*. 2005; 151: 3127–3135.
- Dalsgaard, I. Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other *Cytophaga*-like bacteria pathogenic for fish. *Ann. Revision. Fish Disease*. 1993; 3: 127-144.
- de Gixa, V. Ueber das Verhalten einiger pathogener Mikroorganismen in Meerwasser. *Infecktions-krankh*. 1889; 6: 162-224.
- Del Cerro A, Marquez I, Guijarro JA. Simultaneous Detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, Three Major Fish Pathogens, by Multiplex PCR. 2002.

- Elsayed EE, Eissa AE, Faisal M. Isolation of *Flavobacterium psychrophilum* from sea lamprey, *Petromyzon marinus L.*, with skin lesions in Lake Ontario. *Journal of Fish Diseases*. 2006; 29: 629–632.
- FAO. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (ed) Departamento de Pesca. Roma, Italia. 2014.
- FAO. *Papel de la FAO en la acuicultura*. (s.d). 2015. Recuperado del sitio web de la FAO: <http://www.fao.org/aquaculture/es/>
- Farzanfar, A. The use of probiotics in shrimp aquaculture FEMS. *Immunology Medicine Microbiology*. 2006; 48: 149–158.
- Gram L, Melchiorse J, Spanggaard B, Huber I, Nielsen TF. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999; 65:969-973.
- Gram L, Lovold T, Nielsen J, Melchiorse J, Spanggaard B. *In vitro* antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture*. 2001; 199:1-11.
- Gómez GD, Balcázar JL. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish FEMS. *Immunology Medicine Microbiology*. 2008; 52: 145–154.
- Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS. Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV). *Fish and Shellfish Immunology*. 2010; 29: 868-874.
- Hedrick RP. Relationships of the host, pathogen and environment: Implications for diseases of cultured and wild fish populations. *Journal of Aquatic Animal Health*. 1998; 10: 107-111.
- Holt RA, JS Rohovec, Fryer JL. Bacterial cold-water disease. In “bacterial disease of fish”. Blackwell Scientific Publications.1993.
- Iranto A, Austin B. Use of probiotics to control furuncolosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*. 2002; 25: 333-342.
- Kim DH, Austin B. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunology*. 2006; 21: 513-524.
- Lara-Flores M, Aguirre-Guzmán G. The use of probiotic in fish and shrimp aquaculture. A review. En: Pérez-Guerra N, Pastrana-Castro L (eds) *Probiotics: Production, Evaluation and Uses in Animal Feed*. Research Signpost, India. 2009; 75-90.
- León J, Ávalos R, Ponce M. *Flavobacterium psychrophilum* y su patología en alevines de *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) del centro piscícola El Ingenio, Huancayo. 2009; 117-124.
- Lilley DM, Stillwell RJ. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganism. *Science*. 1965; 147: 747-748.

- Loch TP, Faisal M. Emerging flavobacterial infections in fish: a review. *Journal of Advanced Research*. 2015; 6: 283-300.
- Lonnstrom LG, Hoffren ML, Wiklund T. *Flavobacterium psychrophilum* associated with mortality of farmed perch, *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Diseases*. 2008; 31: 793–797.
- Madsen L, Arnbjerg J, Dalsgaard I. Radiological examination of the spinal column in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): experiments with *Flavobacterium psychrophilum* and oxytetracycline. *Aquaculture Research*. 2001; 32: 235-241.
- MAGRAMA .*Plan estratégico plurianual de la acuicultura española (s.d)*. Recuperado del sitio web del: <http://www.magrama.gob.es/es/pesca/temas/aciicultura/plan-estrategico/documentos/>
- McVicar AH. Interactions of pathogens in aquaculture with wild fish populations. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 1997; 17: 197-200.
- Merrifield D, Dimitroglu A, Foey A, Davies S, Baker RTM, Bøgwald J, Castex M, Ringø E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*. 2010; 302: 1-18.
- Moriarty DJW. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*. 1998; 164: 351-358.
- Nayak SK. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*. 2010; 29: 2-14.
- Nematollahi A, Decostere A, Pasmans F, Ducatelle A, Haesebrouck. Adhesion of high and low virulence *Flavobacterium psychrophilum* strains to isolated gill arches of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Diseases Aquatic Organization*. 2003; 55: 101–107.
- Nikoskelainen S, Salminen S, Bylund G, Ouwehand A. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious disease in fish. *Applied Environmental Microbiology*. 2001; 23: 747-759.
- Nikoskelainen S, Ouwehand AC, Bylund G, Salminen S, Lilius EM. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunology*. 2003; 15: 443-452.
- Padrós F, Furones MD. Patología bacteriana en piscicultura. 2002; 34: 13-21.
- Panigrahi A, Kiron V, Kobayashi T, Puangkaew J, Satoh S, Sugita H. Immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum) induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus*. *Veterinary Immunology. Immunopathology*. 2004; 102: 379-388.
- Panigrahi A, Kiron V, Puangkaew J, Kobayashi T, Satoh S, Suhita H. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*. 2005; 243: 241-254.

- Pérez-Sánchez T, Balcázar JL, García Y, Halaihel N, Vendrell D, de Blas I, Merrifield D, Ruiz-Zarzuela I. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *Journal of Fish Diseases*. 2011; 34: 499-507.
- Pérez-Sánchez T, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Bálcazar JL. Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Reviews in Aquaculture*. 2014; 6: 133-146.
- Raida MK, Larsen JL, Nielsen ME, Buchmann K. Enhanced resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus 2B). *Journal of Fish Diseases*. 2003; 26: 495-498.
- Ramsrud AL, LaFrentz SA, LaFrentz BR, Cain KD, Call DR. Differentiating 16S rRNA alleles of *Flavobacterium psychrophilum* using a simple PCR assay. *Journal of Fish Diseases*. 2007; 30: 175-180.
- Rangdale RE, RH Richards, Aldeman DJ. Isolation of *Cytophaga psychrophila*, causal agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS) from reproductive fluids and egg surface of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum). *Bulletin of the European Association Of Fish Pathologists*. 1996; 16: 63-67.
- Reglamento (CE) № 911/2009 de la Comisión de 29 de septiembre de 2009 relativo a la autorización de un nuevo uso del preparado de *Pediococcus acidilactici* CNCM MA 18/5M como aditivo en piensos para salmonidos y gambas (titular de autorización: Lallemand SAS; L257/10-11 de 30 de septiembre de 2009.
- Reglamento de Ejecución (UE) № 95/2013 de la Comisión de 1 de febrero de 2013 relativo a la autorización de un preparado de *Pediococcus acidilactici* CNCM MA 18/5M como aditivo para piensos destinados a todos los peces, excepto los salmonidos (titular de la autorización: Lallemand SAS); L33/19-20 de 2 de febrero de 2013.
- Ringø E, Schillinger U, Holzapfel W. Antibacterial abilities of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and the use of lactic acid bacteria in aquaculture. En: Holzapfel, W. Naughton, P. (Eds.), *Microbial Ecology in Growing Animals*. Elsevier, Edinburgh. 2005.
- Roberts RJ. *Fish Pathology*. WB Saunders. Harcourt Publishers Ltd. London. 2012.
- Sharifuzzaman SM, Austin B. Development of protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum) to *Vibrio anguillarum* following use of the probiotic *Kocuria* SM1. *Fish and Shellfish Immunology*. 2010; 29: 212-216.
- Smith V.H. Applicability of resource-ratio theory to microbial ecology. *Limnology and Oceanography*. 1993; 239-249.
- Sørum H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In: Aarestrup FM. (Ed.)

Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal origin. American Society for Microbiology. 2006; 213-238.

-Spanggaard B, Huber I, Nielsen J, Sick EB, Pipper CB, Martinussen T, Slierendrecht WJ, Gram L. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environmental Microbiology*. 2001; 3: 755-765.

-Ström-Bestor M, Wiklund T. Inhibitory activity of *Pseudomonas* sp. on *Flavobacterium psychrophilum*, *in vitro*. *Journal of Fish Diseases*. 2011; 34: 255-264.

-Sugita, H, Shibuya K, Shimooka H, Deguchi Y. Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture*. 1996; 145: 195-203.

-Sugita H, Kawasaki J, Deguchi Y. Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. *Application Microbiology*. 1997; 24: 105-108.

-Sugita H, Hirose Y, Matsuo N, Deguchi Y. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture*. 1998; 165: 269-280.

-Tinh NTN, Dierckens K, Sorgeloos P, Bossier P. A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Marine Biotechnology*. 2008; 10: 1-12.

-van Nuenen MHMC, de Ligt RAF, Doombos RP, van der Woude JCJ, Kuipers EJ, Venema K. The influence of microbial metabolites on human intestinal epithelial cells and macrophages *in vitro*. *FEMS Immunology and Medicine Microbiology*. 2005; 45: 183-189.

-Vendrell D, Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Gironés O, Múzquiz JL. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2008; 31: 337-345.

-Verschueren L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000; 64: 655-671.

-Vine NG, Leukes WD, Kaiser H. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology*. 2006; 30: 404-427.

-Zivkovic, R. Probiotics or microbes against microbes. *Acta Medicine Croat*. 1999; 53: 23-28.