



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

Tesis Doctoral

SELECCIÓN DE PROBIÓTICOS

**INMUNOESTIMULANTES EN LENGUADOS (*Solea
senegalensis* K) FRENTE A *Vibrio harveyi* Y *Photobacterium
damselae* subsp. *piscicida***

Alberto Medina López

PROGRAMA DE DOCTORADO

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

2018

DIRECTORES


Dr. Salvador Arijo Andrade

Dr. Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Alberto Medina López

 <http://orcid.org/0000-0003-2657-8364>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

Selección de probióticos inmunoestimulantes en lenguados (*Solea senegalensis* K.)
frente a *Vibrio harveyi* y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Memoria presentada por D. Alberto Medina López para optar al grado de Doctor.

Directores

Dr. Salvador Arijo Andrade

Dr. Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez

Enero 2018



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

D. JUAN JOSÉ BORREGO GARCÍA, Catedrático de Microbiología y Director del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

INFORMA QUE:

Don Alberto Medina López ha realizado en los laboratorios de este Departamento el trabajo experimental conducente a la elaboración de la presente memoria de Tesis Doctoral.

Y para que así conste expido el presente informe,

Málaga a 24 de enero de 2018



Prof. Dr. Juan J. Borrego



INFORME DE LOS DIRECTORES

La presente Tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, bajo la dirección de la Dr. Salvador Arijó Andrade, Profesor Contratado Doctor de Microbiología de la Universidad de Málaga, y el Dr. Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Málaga, que dan su conformidad a la memoria de la Tesis titulada: “Selección de probióticos inmunoestimulantes en lenguados (*Solea senegalensis* K) frente a *Vibrio harveyi* y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*” presentada por el Doctorando Don Alberto Medina López para optar al Título de Doctor por la Universidad de Málaga.

Málaga, Enero de 2018



Fdo: Salvador Arijó Andrade



Fdo: Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez



Los ensayos realizados en esta Tesis han sido financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad a través del proyecto “Selección de probióticos inmunoestimulantes en lenguados (*Solea senegalensis*, K) frente a *Vibrio harveyi* y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*” (AGL2010-17789).

Parte de los resultados obtenidos en la presente Tesis han sido publicados y comunicados en las siguientes revistas y congresos:

Publicaciones:

- Medina, A., Mancera, J. M., Martínez-Manzanares, E., Moriñigo, M. A., & Arijo, S. (2015). Identification of *Vibrio harveyi* proteins involved in the specific immune response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *Fish & shellfish immunology*, 47 (1), 377-380.

Congresos internacionales:

- **Título de la aportación:** Identification of *Vibrio harveyi* proteins involved in specific immune response of Senegalense solea (*Solea senegalensis*)
Nombre del congreso: Aquaculture
Tipo de evento: Poster en Congreso
Ámbito: Internacional
Año: 2013
Lugar: Gran Canaria; España
- **Título de la aportación:** Identification of *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* proteins involve in specific immune response of Senegalense sole
Nombre del congreso: Aquaculture Europe 10
Tipo de evento: Poster en Congreso
Ámbito: Internacional
Año: 2010
Lugar: Oporto; Portugal

Congresos nacionales:

- **Título de la aportación:** Detección de componentes inmunogénicos para lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup) en los productos extracelulares de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Nombre del congreso: XIV Congreso Nacional de Acuicultura

Tipo de evento: Poster en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2013

Lugar: Gijón; España

- **Título de la aportación:** El uso de probióticos inmunoestimulantes como método preventivo en enfermedades causadas por *Vibrio harveyi* y *Photobacterium damsela* en peces cultivados.

Nombre del congreso: Foro Iberoamericano de los recursos marinos y la acuicultura.

Tipo de evento: Poster en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2012

Lugar: Cádiz. España

A mis padres y a mi hermano.

Yo conozco que todo lo puedes
Job 42:2



AGRADECIMIENTOS

Uno de los momentos más complicados (aunque también más satisfactorios) de esta tesis es agradecer a todas aquellas personas que de una forma u otra han colaborado en este trabajo.

- ❖ En primer lugar a mis directores de tesis, Salvador y Miguel Ángel. A Salva por toda la confianza puesta en mi labor científica, y haberme acompañado en este largo viaje (incluso a Cádiz). He aprendido contigo muchas cosas, tanto en la ciencia como en la vida.
- ❖ A Miguel Ángel por su visión diferente de las cosas, siempre interesado por darme sabios consejos.
- ❖ A todos mis compañeros de grupo de investigación, en especial a Milena y Jose Alberto, quienes siempre estuvieron conmigo y me ayudaron cuando lo necesité. Algunas veces necesitamos compartir la mochila, y ellos estuvieron para auparme hasta la cima. A Silvana por ser mi oráculo particular y siempre sacar un poco de tiempo para mis dudas. A los que llegan al grupo, como Marta, siempre con ganas de aprender cosas nuevas, y siempre con una sonrisa. Y a los que se fueron, como Fran y Bea, a quienes siempre eché de menos.
- ❖ A los buenos investigadores que he conocido a lo largo de esta tesis, como Sonia, Danielle, Leonardo, Ligia, e Inés.
- ❖ A María y a Carmen, siempre ayudando en asuntos ajenos a mi investigación.
- ❖ A todas mis tribus. Recuperaremos el tiempo perdido.
- ❖ Y por último agradecer a mi familia, ese pilar tan importante en mi vida. A mi hermano Juan Antonio, de quien siempre me acuerdo. Gracias a mis padres por su apoyo incondicional, su paciencia (mucha), y construir la persona que soy.



2D	Dos dimensiones
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	ADN complementario
AEC	3-amino-9-etilcarbazol
AIP56	Proteína inductora de apoptosis
ANOVA	Análisis de la varianza (<i>ANalysis Of VAriance</i>)
anti-Ig	Anti-Inmunoglobulina
APROMAR	Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos.
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (del inglés <i>American Type Culture Collection</i>)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina sérica bovina (del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CLSI	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (del inglés <i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>)
Ct	Ciclo umbral (del inglés, <i>Threshold Cycle</i>)
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (del inglés, <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
DL50	Dosis letal 50
dNTP	Desoxiribonucleótido trifosfato
dT	Desoxitimidina
DO	Densidad Óptica

Abreviaturas

€	Euro
ECP	Productos extracelulares
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (del inglés <i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i>)
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (del inglés <i>European Food Security Authority</i>)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
FAO	Organización de Naciones Unidas para La Agricultura, Pesca y Alimentación (del inglés <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FIA	Adyuvante incompleto de Freund
H'	Índice de diversidad de Shannon
Ig	Inmunoglobulina
IPG	Gradiente inmovilizado de pH (del inglés <i>Immobilized pH Gradient</i>)
Jacumar	Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos
kDa	Kilodaltons
LPS	Lipopolisacátido
MALDI TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz – Tiempo de vuelo (del inglés <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight</i>)
MAPAMA	Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica (del inglés <i>National Center for Biotechnology</i>)
O/F	Oxidación fermentación
OMP	Proteínas de la membrana externa (del inglés <i>Outer Membrane Protein</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPD	Dihidrocloreuro de ortofenilendiamina (del inglés <i>o-phenylenediamine dihydrochloride</i>)
pb	Pares de bases nucleotídicas

pI	Punto isoeléctrico
p/v	Peso/volumen
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PBS-T	PBS con Tween 20 al 0,25 %
PBS-T-BSA	PBS con Tween 20 al 0,25 % y BSA al 3 %
PBS-T-L	PBS con Tween 20 al 0,25 % y leche desnatada al 3 %
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso Molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés <i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>)
PPI	Píxeles por pulgada (del inglés <i>Pixels Per Inch</i>)
PPM	partes por millón
qPCR	PCR cuantitativa (del inglés <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
R	Riqueza de especies
Rr	Habitabilidad
RPS	Porcentaje relativo de supervivencia (del inglés <i>Relative Percent Survival</i>)
SD	Desviación estándar
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sulfato (del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
TBE	Tris base ácido etilendiaminotetraacético
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TSA	Agar soja tripticasa (del inglés <i>Tryptone Soya Agar</i>)
TSAs	TSA con NaCl al 2% de concentración final
TSB	Caldo soja tripticasa (del inglés <i>Tryptone Soya Broth</i>)

Abreviaturas

TSBs	TSB con NaCl al 2% de concentración final.
TTSS	Sistema de secreción tipo III
ufc	Unidades formadoras de colonias
U	Unidades de enzima
UE	Unión Europea
WWF	Fondo Mundial para la Naturaleza (del inglés <i>World Wildlife Fund for Nature</i>)

INTRODUCCIÓN	27
1.Situación actual de la acuicultura	29
1.1. La acuicultura a nivel global	29
1.2. La acuicultura en Europa.....	31
1.3. Acuicultura en España.....	33
1.4. El cultivo del lenguado.....	34
2. Características generales de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	36
2.1. Características morfológicas y bioquímicas.....	36
2.2. Modo de transmisión e infección	37
2.3. Mecanismos de patogenicidad	39
3. Características generales de <i>Vibrio harveyi</i>	40
3.1. Características morfológicas y bioquímicas.....	40
3.2. Modo de transmisión e infección	42
3.3. Mecanismos de patogenicidad	42
4. El uso de antibióticos en acuicultura frente a las enfermedades bacterianas y su impacto	44
5. Vacunación.....	45
5.1. Clasificación de las vacunas según la composición	47
5.2. Vías de administración de la vacuna	49
5.3. El uso de vacunas frente a en <i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>piscicida</i> y <i>Vibrio harveyi</i>	51
5.4. Limitaciones del proceso de vacunación.....	55
6. Probióticos	55
6.1. El uso de probióticos en acuicultura	56
6.2. Criterios de selección de probióticos	61
6.3. Rutas de administración	62
6.4. Mecanismos de acción de los probióticos	63
6.4.1. Exclusión competitiva.....	63
6.4.2. Mejora de la digestión	66
6.4.3. Estimulación del sistema inmunitario	67
6.5. Seguridad y evaluación de probióticos.....	71
7. Hipótesis de partida	73
OBJETIVOS	75

MATERIAL y MÉTODOS	79
1.Obtención de anticuerpos de <i>Solea senegalensis</i> frente a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y <i>V. harveyi</i> e identificación de las proteínas más inmunogénicas	81
1.1. Animales empleados	81
1.2. Cepas bacterianas	82
1.3. Obtención de bacterina.....	82
1.4. Extracción de Productos Extracelulares (ECP).....	82
1.5. Inmunización de los peces.....	83
1.6. Titulación de anticuerpos específicos en el suero (ELISA)	85
1.7. Determinación de las proteínas inmunorreactivas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y <i>V. harveyi</i> para <i>Solea senegalensis</i>	86
2.Selección y caracterización de probióticos potenciales con similitud antigénica frente a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y <i>V. harveyi</i>	91
2.1. Cepas ensayadas	91
2.2. Selección de bacterias con antígenos comunes	91
2.3. Estudio de la capacidad antagonista de las cepas seleccionadas sobre el crecimiento de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y <i>V. harveyi</i>	92
2.3. Selección de cepas con proteínas antigénicamente similares a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y <i>V. harveyi</i>	94
2.4. Identificación de las cepas potencialmente probióticas	94
2.5. Determinación de la inocuidad de las cepas seleccionadas y su capacidad para inducir la producción de anticuerpos en <i>Solea senegalensis</i>	95
2.6. Detección de las proteínas de las cepas seleccionadas que generan reacción cruzada con las cepas patógenas.....	96
2.7. Estudios complementarios de las cepas seleccionadas como potencialmente probióticas	97
2.8. Tratamiento de los datos	102
3. Efecto de la cepa <i>Vibrio proteolyticus</i> DCF12.2 sobre el sistema inmunitario de lenguados y protección frente a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y <i>V. harveyi</i>	103
3.1. Detección de anticuerpos	104
3.2. Expresión de genes implicados en la respuesta inmune innata.....	105
3.3. Análisis de la microbiota de lenguados tratados con <i>V. proteolyticus</i> DCF12.2	108
3.4. Determinación de la supervivencia de peces administrados con probiótico e infectados con <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y <i>V. harveyi</i>	112
3.5. Tratamiento de datos	113

4.- Empleo combinado de la cepa <i>Vibrio proteolyticus</i> DCF12.2 y de una vacuna bivalente frente <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y <i>V. harveyi</i>	113
4.1. Determinación de anticuerpos en el suero y mucus de los peces	115
4.2. Análisis de la microbiota de la piel	115
4.3. Infecciones experimentales con los patógenos y determinación del grado de protección de los tratamientos.....	115
4.4. Tratamiento de datos	116
RESULTADOS.....	117
1. Obtención de anticuerpos de <i>Solea senegalensis</i> frente a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y <i>V. harveyi</i> e identificación de las proteínas más inmunogénicas.....	119
1.1. Obtención de anticuerpos frente a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> e identificación de las proteínas más inmunogénicas.....	119
1.2. Obtención de anticuerpos frente a <i>V. harveyi</i> e identificación de sus proteínas más inmunorreactivas	123
2. Selección y caracterización de probióticos potenciales con similitud antigénica y capacidad antagonista frente a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> Lg41.00 y <i>V. harveyi</i> Lg16.00	127
2.1. Selección de bacterias con antígenos comunes	127
2.2. Estudio de la capacidad antagonista de las cepas seleccionadas sobre el crecimiento de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y <i>V. harveyi</i>	129
2.3. Selección de cepas con proteínas antigénicamente similares a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y <i>V. harveyi</i>	130
2.4. Identificación de las cepas potencialmente probióticas	131
2.5. Determinación de la inocuidad de las cepas seleccionadas y su capacidad para inducir la producción de anticuerpos en <i>Solea senegalensis</i>	132
2.6. Detección de las proteínas de las cepas seleccionadas que generan reacción cruzada con las cepas patógenas.....	133
2.7. Estudios complementarios de las cepas seleccionadas como potencialmente probióticas	138
3. Efecto de la cepa <i>Vibrio proteolyticus</i> DCF12.2 sobre el sistema inmunitario de lenguados y protección frente a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y <i>V. harveyi</i>.....	145
3.1. Detección de anticuerpos	145
3.2. Expresión de genes implicados en la respuesta inmune innata.....	150
3.3. Análisis de la microbiota de lenguados tratados con <i>V. proteolyticus</i> DCF12.2	152
3.4. Determinación de la supervivencia de peces administrados con probiótico e infectados con <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y <i>V. harveyi</i>	158

4. Empleo combinado de la cepa <i>Vibrio proteolyticus</i> DCF12.2 y de una vacuna bivalente frente <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y <i>V. harveyi</i>	159
4.1. Determinación de anticuerpos en el suero y mucus de los peces	159
4.2. Análisis de la microbiota de la piel	163
4.3. Infecciones experimentales con los patógenos y determinación del grado de protección de los tratamientos.....	167
DISCUSIÓN.....	169
1. Obtención de anticuerpos de <i>Solea senegalensis</i> frente a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y <i>V. harveyi</i> e identificación de las proteínas más inmunogénicas	171
2. Selección y caracterización de probióticos potenciales con similitud antigénica y capacidad antagonica frente a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> Lg41.00 y <i>V. harveyi</i> Lg16.00	175
3. Efecto de la cepa <i>Vibrio proteolyticus</i> DCF12.2 sobre el sistema inmunitario de lenguados y protección frente a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y <i>V. harveyi</i>	186
4. Empleo combinado de la cepa <i>Vibrio proteolyticus</i> DCF12.2 y de una vacuna bivalente frente <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y <i>V. harveyi</i>	197
Resumen de la discusión y perspectivas futuras.....	201
CONCLUSIONES.....	205
BIBLIOGRAFÍA.....	209
ANEXOS.....	259
ARTICULOS.....	299

RESUMEN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

RESUMEN

El desarrollo de la acuicultura se ve limitado por la aparición de enfermedades infecciosas, entre las que se encuentran las producidas por *Vibrio harveyi* y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, patógenos para lenguados (*Solea senegalensis*). Como medida profiláctica se han usado tanto las vacunas como las bacterias probióticas. Una característica que pueden poseer los probióticos es la de activar la respuesta inmunitaria. Además existen bacterias que poseen antígenos comunes a lo patógenos, generando reacción cruzada, donde los anticuerpos producidos por la cepa reaccionarían con los antígenos del patógeno. De esta forma un probiótico con estas características podría utilizarse de forma similar a una vacuna viva. Por tanto en este trabajo se propuso la búsqueda y selección de bacterias probióticas con capacidad antagonista frente a *P. damsela* y *V. harveyi*, y similitud antigénica.

Se estudiaron 718 cepas aisladas de agua de mar y de peces. Estas se seleccionaron, en fases sucesivas, en base a la existencia de antígenos comunes con los patógenos (*dot blot* y *Western blot*) y su capacidad de inhibir el crecimiento de los patógenos *in vitro*. De este proceso se seleccionaron 5 cepas, a las que se determinaron su avirulencia, activación de la respuesta inmunitaria, y características fisiológicas.

Finalmente se seleccionó la cepa *Vibrio proteolyticus* **DCF12.2** para su administración a lenguados, caracterizada por su capacidad de inhibición de ambos patógenos y por la presencia de antígenos comunes con estos. Los resultados mostraron que la bacteria activó la respuesta inmunitaria de los peces, siendo la inoculación intraperitoneal la que generó una mayor producción de anticuerpos. También se detectó anticuerpos en el mucus de los peces. La ingestión del probiótico aumentó la diversidad microbiana en el tracto intestinal.

La administración de *V. proteolyticus* **DCF12.2** por vía intraperitoneal, oral y baño dio un 30-40 % de protección frente a *P. damsela* subsp. *piscicida*. En el caso de *V. harveyi*, la administración intraperitoneal del probiótico dio un 67 % de protección, mientras que los tratamientos por baño y dieta no protegieron. Finalmente se realizó un ensayo combinando la acción de una vacuna bivalente frente a los dos patógenos junto a la administración del probiótico (ambos por baño). Tras la infección experimental con *P. damsela* se obtuvo una protección del 10 % con el probiótico, un 30 % con la

Resumen

vacuna, y un 40 % con la combinación vacuna-probiótico. En el caso de los peces infectados con *V. harveyi* se obtuvo una protección del 50 % en todos los tratamientos.

En conclusión: la cepa seleccionada mostró un gran potencial para ser utilizada en la prevención de enfermedades causadas por *V. harveyi* y *P. damsela* subsp. *piscicida*.

INTRODUCCIÓN



1. Situación actual de la acuicultura

1.1. La acuicultura a nivel global

El crecimiento poblacional y el desarrollo económico son los factores más importantes que conducen a un aumento en la demanda de productos pesqueros de alta calidad (Bush *et al.*, 2013). La producción global de alimentos debe subir un 70 % entre 2010 y 2050 para una población que se estima en más de 9 mil millones de personas en 2050, y en la que en la actualidad más de 800 millones de personas sufren aun desnutrición crónica (Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos; APROMAR, 2016).

En las últimas cinco décadas la producción acuícola ha crecido de manera constante a un ritmo del 3,2 % (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura; FAO, 2014) (**Figura 1**), y de manera espectacular desde los 80, superando el ritmo de crecimiento de la población mundial que es del 1,6 %. Gran parte de esa población tiene al pescado como única fuente de proteína (3 mil millones, según el Fondo Mundial de la Naturaleza, WWF, 2015). Sin embargo la extracción pesquera se ha estancado, por lo que dicha demanda se mantiene gracias al incremento de la producción acuícola (**Tabla 1**).

El cultivo tanto de peces como de plantas acuáticas se conoce en algunas regiones del mundo desde hace 4.000 años. En 2014, el 84 % de la acuicultura se encontraba en Asia y más concretamente en más del 60 % en China, mientras que la Unión Europea es el principal mercado importador del mundo (FAO, 2016).

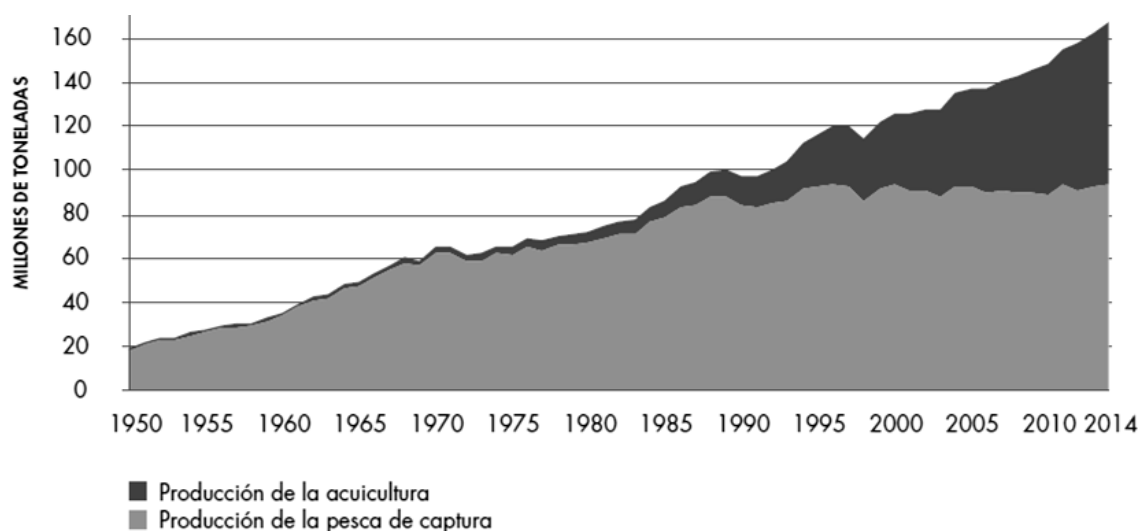


Figura 1. Evolución desde la década de 1950 hasta 2014 del volumen de capturas mundiales tanto en acuicultura como de pesca extractiva. (The State of World Fisheries and Aquaculture 2016, FAO).

Tabla 1. Producción en capturas pesqueras y acuicultura, y su utilización en millones de toneladas (excluyendo plantas acuáticas) (FAO, 2016).

	2009	2010	2011	2012	2013	2014
PRODUCCIÓN						
Pesca de captura						
Continental	10,5	11,3	11,1	11,6	11,7	11,9
Marina	79,7	77,9	82,6	79,7	81,0	81,5
Total de Capturas	90,2	89,1	93,7	91,3	92,7	93,4
Pesca de acuicultura						
Continental	34,3	36,9	38,6	42,0	44,8	47,1
Marina	21,4	22,1	23,2	24,4	25,5	26,7
Total Acuicultura	55,7	59,0	61,8	66,5	70,3	73,8
TOTAL PESCA GLOBAL	145,9	148,1	155,5	157,8	162,9	167,2
UTILIZACIÓN						
Consumo humano	123,8	128,1	139,8	136,9	141,5	146,3
Uso no alimentario	22,0	20,0	24,7	20,9	21,4	20,9
Población (miles de millones)	6,8	6,9	7,0	7,1	7,2	7,3
Suministro per cápita de pescado (kg)	18,1	18,5	18,6	19,3	19,7	20,1

1.2. La acuicultura en Europa

La acuicultura juega un importante papel en la producción de productos acuáticos de calidad en la Unión Europea, desempeñando un papel muy significativo en el desarrollo social y económico de determinadas zonas. Las especies con mayor producción en 2014 fueron el mejillón (493.192 t), la trucha (194.081 t) y el salmón (175.090 t) (**Tabla 2**) predominando el cultivo de peces (51,4 %) frente a los moluscos (48,5 %) frente de agua salada (27 %) y agua dulce (23 %). Respecto al valor de venta se encontraron como especies predominantes el salmón (978,2 millones de €), la trucha (613,6 millones de €) y el mejillón (523,0 millones de €) (**Tabla 3**).

Tabla 2. Principales especies producidas mediante acuicultura en la Unión europea, por tonelada y porcentaje del total, en 2014 (FAO).

Especie	Producción	% Producción
Mejillón	493.192	38,4
Trucha	194.081	15,1
Salmón	175.090	13,6
Ostión japonés	86.371	6,7
Dorada	85.843	6,7
Lubina	63.965	5,0
Carpa	70.938	5,5
Almeja japonesa	31.651	2,5
Rodaballo	11.849	0,9
Resto de especies	72.429	5,6

Tabla 3. Principales especies producidas mediante acuicultura en la Unión europea, por valor en millones de € y porcentaje del total, en 2014 (FAO).

Especie	Valor	% Valor
Salmón	978,2	23,4
Trucha	613,6	14,7
Mejillón	523,0	12,5
Ostión japonés	452,2	10,8
Dorada	448,8	10,7
Lubina	406,5	9,7
Carpa	151,1	3,6
Almeja japonesa	136,5	3,3
Rodaballo	74,6	1,8
Resto de especies	393,5	9,4

La producción europea de peces de acuicultura, según datos de 2014, sumó 660.787 toneladas, con un crecimiento del 1,6 % respecto a 2013; y el valor total de los peces de acuicultura fue de unos 2.993 millones de €, lo que supone un incremento del 5,5 % respecto de 2013 (APROMAR, 2016).

España con 282.242 t (22,0 % del total de la UE), Reino Unido 204.617 t (15,9 %) y Francia 204.300 t (el 15,9 %) encabezaron la producción en acuicultura en 2014, aunque si consideramos el valor de la producción, el Reino Unido es el primer productor con 1.016,3 millones de € (23,8 % del valor total), seguido por Francia con 774,2 millones de € (18,8 %) y Grecia con 472,9 millones de € (11,6 %) en 2014. España ocupa la cuarta posición con 450,1 millones de € (10,2 %). A pesar de la importancia de la acuicultura en zonas costeras y continentales, y las sucesivas directivas que se han fijado para aumentar la seguridad y calidad de la producción acuícola, no se ha conseguido que la tasa de producción acuícola comunitaria crezca a la misma tasa que en el resto del mundo.

Los principales objetivos que ha fijado la Unión Europea en materia de acuicultura sostenible se encuentran recogidos en las directrices estratégicas para el desarrollo sostenible de la acuicultura de los países de la Unión Europea hasta 2020

(Reglamento (CE) nº 508/2014). Estas líneas estratégicas son la innovación, la diversificación de la acuicultura y el respeto al medio ambiente.

1.3. Acuicultura en España

La producción acuícola hasta los años 80 se centraba en empresas pequeñas de cultivo del mejillón en Galicia, cultivo de la trucha arco iris, y acuicultura en los esteros gaditanos. En los años 90 se vivió el despegue de la acuicultura cuando se incorporan nuevas especies como el rodaballo en el norte de España; la dorada y la lubina en el Sur, Levante y Canarias. Actualmente España posee una producción de 282.242 t, mayoritariamente moluscos (APROMAR, 2016). Casi el 80 % se corresponde con mejillones (220.449 t) y el resto son lubinas (17.376 t), doradas (16.230 t), rodaballos (6.814 t) y truchas arco iris (15.111 t) (APROMAR, 2016). Los principales núcleos de acuicultura se encuentran en Galicia, Cataluña y Andalucía, proporcionando una alternativa al desarrollo de las zonas costeras, muy dependientes a la pesca tradicional, proporcionando empleo a 20.000 personas. La mayor parte de la acuicultura se lleva a cabo en zonas marinas.

La clave para el desarrollo de la acuicultura en España pasa por mejorar la investigación, favorecer el desarrollo tecnológico y la diversificación cultivos (APROMAR, 2016). El crecimiento de la producción en acuicultura debe estar aparejado con el mantenimiento y preservación del bienestar de los peces. La mala manipulación, el transporte deficitario, desnutrición o una alta densidad de peces almacenados, pueden conllevar al aumento de la susceptibilidad en la aparición de numerosas enfermedades debido a una depresión en el sistema inmune del pez (Ashley, 2007).

Dentro de los objetivos de diversificación del cultivo de peces, se ha abordado la cría de una gran diversidad de especies (**Tabla 4**), entre las que destaca el cultivo de lenguado (*Solea spp.*), dada su elevada demanda en el mercado (APROMAR, 2016).

Tabla 4. Especies de baja producción comercial en toneladas en acuicultura marina de España (Jacumar, 2014)

Nombre comercial	Nombre científico	Total
Anguila europea	<i>Anguilla anguilla</i>	395,83
Baila	<i>Dicentrarchus punctatus</i>	0,80
Besugo	<i>Pagellus bogaraveo</i>	184,19
Especies de estero	<i>Especies de estero</i>	4,20
Fúndulo o piraña	<i>Fundulus heteroclitus</i>	3,22
Lenguado europeo	<i>Solea solea</i>	485,47
Lenguado senegalés	<i>Solea senegalensis</i>	272,27
Lisa	<i>Chelon labrosus</i>	174,74
Pejerrey	<i>Atherina boyeri</i>	0,67
Sargo	<i>Diplodus sargus</i>	1,56

1.4. El cultivo del lenguado

Los lenguados provienen de la familia de los Soleidos, formando parte del orden Pleuronectiformes, llamado popularmente peces planos debido a su morfología. Existen diversas especies que se encuentran en el Mediterráneo siendo las más importantes el lenguado común (*Solea solea*) y el lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) siendo esta última la que se adapta mejor a las características de cultivo en la zona sur de la península ibérica (Dinis *et al.*, 1999).

El lenguado senegalés tiene una gran similitud morfológica y biológica con el lenguado común y se diferencia por la coloración negra de la aleta pectoral al lado de los ojos, mientras que el lenguado común presenta una única mancha negra cerca del borde de la aleta pectoral al lado de los ojos (Desoutter, 1990).

Se localiza en el Atlántico, desde el Golfo de Vizcaya (región de La Rochelle) hasta las costas de Senegal, aunque también se encuentra en el Mediterráneo Occidental con menos frecuencia.

Es un pez bentónico que vive en fondos arenosos o fangosos, que habitan el fondo decursos de agua dulce y salada. Los adultos se alimentan de pequeños invertebrados, principalmente poliquetos bivalvos y, en menor medida de pequeños crustáceos (Braber y De Groot, 1973).

El interés por el lenguado en la acuicultura surge por la necesidad de diversificación de la acuicultura española (APROMAR, 2016). Desde los últimos treinta años, el lenguado senegalés es la especie con mayor potencial en acuicultura en el sur de Europa y en los países mediterráneos, especialmente España y Portugal (Dinis *et al.*, 1999), consolidando su cultivo debido al aumento en las investigaciones sobre su reproducción, desarrollo y su precio en el mercado (Castelo Branco *et al.*, 2010; Cañavate, 2011; Morais *et al.*, 2014). Además, gastronómicamente es uno de los peces más solicitados debido a que sus filetes no poseen espinas y tiene una textura suave.

En 2015 se produjeron 664 t de lenguado, localizadas en Andalucía, Galicia y Canarias (APROMAR, 2016). Respecto a 2013 hubo un incremento de producción del 33,2 % por lo que tiene una potencia real de expansión para los próximos años dentro de la acuicultura española, y está en un momento de despegue a la vista de cómo se ha incrementado el precio a medida que disminuyen las capturas marinas. Los costes de producción del lenguado se encuentran en 9,62 € por kilo (Mispeces.com, 2014) con un precio de venta al público de 17,74 € por kg (MAPAMA, 2015).

A pesar del esfuerzo realizado en I+D y los ensayos a escala industrial, uno de los principales limitantes en la producción del lenguado es su vulnerabilidad a diversas enfermedades infecciosas, tanto víricas (encefalopatía y retinopatía producidas por betanodavirus (Oliveira *et al.*, 2008), como bacterianas (**Tabla 5**), por lo que es necesaria la aplicación de vacunas y una mejora de las medidas profilácticas (Dinis *et al.*, 1999; Anguis y Cañavate, 2005).

La fotobacteriosis es a día de hoy una de las principales causas de importantes pérdidas en el cultivo de lenguado senegalés, llegando a ser uno de los principales factores limitantes en la producción de dicha especie (Toranzo *et al.*, 2005). Tanto *P. damsela* subsp. *piscicida* como *V. harveyi* han sido descritas como las bacterias más frecuentemente aisladas en brotes aparecidos en cultivos de lenguados del sur de España (Arijo *et al.*, 2005a).

Tabla 5. Principales enfermedades bacterianas que afectan a *Solea senegalensis*.

Enfermedad	Patógeno	Referencia
Edwardsielosis	<i>Edwardsiella tarda</i>	Castro <i>et al.</i> , 2012
Flexibacteriosis	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Costas <i>et al.</i> , 2014
Fotobacteriosis	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Zorrilla <i>et al.</i> , 1999; Romalde, 2002; Magariños <i>et al.</i> , 2003; Arijo <i>et al.</i> , 2005a,b
Furunculosis	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	Magariños <i>et al.</i> , 2011
Vibriosis	<i>Vibrio harveyi</i>	Zorrilla <i>et al.</i> , 2003; Arijo <i>et al.</i> , 2005a,b; Toranzo <i>et al.</i> , 2005; Rico <i>et al.</i> , 2008
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Zorrilla <i>et al.</i> , 2003; Arijo <i>et al.</i> , 2005a

2. Características generales de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

P. damsela es el agente causal de la fotobacteriosis (también denominada pasteurelisis o pseudotuberculosis), una enfermedad grave que posee una alta distribución global y afecta a una gran variedad de especies de peces de importancia en la acuicultura (Rigos y Katharios, 2010). Aunque esta enfermedad fue descrita por primera vez en poblaciones salvajes de perca (*Morone americanusen*) y lubina rayada (*Morone saxatilis*) en Estados Unidos, posee en la actualidad un amplio rango de hospedadores en peces marinos (**Tabla 6**) (Romalde, 2002).

2.1. Características morfológicas y bioquímicas

P. damsela subsp. *piscicida* es una bacteria halófila de la familia *Vibrionaceae* (Janssen y Surgalla, 1968). Ha sido descrita por varios autores (Snieszko *et al.*, 1964; Janssen y Surgalla, 1968; Hawke *et al.*, 1987; Toranzo *et al.*, 1991; Nakai *et al.*, 1992) como una bacteria pleomórfica (de $0.5 \times 1.5 \mu\text{m}$ de tamaño), Gram negativa, anaerobia facultativa con una pronunciada tinción bipolar, oxidasa y catalasa positiva, fermentativa pero sin producción de gas en medio O/F y sensible al vibriostático 0/129. *P. damsela* subsp. *piscicida* es negativa para indol, ureasa, gelatinasa, amilasa, arginina dihidrolasa y muestra lipasa y actividades fosfolipasa y la producción de sulfuro de

hidrógeno. Aunque se consideraba un taxón homogéneo al aplicarse técnicas moleculares como el ribotipado y RAPD se ha rebatido esta homogeneidad (Romalde 2002). La temperatura óptima de crecimiento es entre 22° C y 30° C aunque *P. damsela* subsp *piscicida* puede crecer entre 15 °C y 33 °C usando como medio agar triptiscasa de soja complementado con un 2 % de NaCl.

Tabla 6. Especies potencialmente hospedadoras de *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*.

Especie cultivada	Referencia
Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Toranzo <i>et al.</i> , 1991; Bakopoulos <i>et al.</i> , 1997
Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Balebona <i>et al.</i> , 1992; Candan <i>et al.</i> , 1996
<i>Platichthys stellatus</i>	Cho <i>et al.</i> , 2013
Cobia (<i>Rachycentron canadum</i>)	Lopez <i>et al.</i> , 2002; Liu, P. C. <i>et al.</i> , 2003; Chu <i>et al.</i> , 2013
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Fukuda <i>et al.</i> , 1996
Urta (<i>Pagrus auriga</i>)	Labella <i>et al.</i> , 2006; García Rosado <i>et al.</i> 2007
Seriola (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	Kimura y Kitao, 1971
Atún (<i>Thunnus thynnus</i>)	Mladineo <i>et al.</i> , 2006
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	Onishi <i>et al.</i> , 1982
Lenguado (<i>Solea senegalensis</i>)	Zorrilla <i>et al.</i> , 1999; Romalde, 2002
Perca americana (<i>Roccus americanus</i>)	Snieszko <i>et al.</i> , 1964
lubina estriada (<i>Morone saxatilis</i>)	Snieszko <i>et al.</i> , 1964
Mero americano (<i>Morone americana</i>)	Snieszko <i>et al.</i> , 1964
Pargo japonés <i>Pagrus major</i>	Yasunaga <i>et al.</i> , 1983
Palometa blanca (<i>Trachinotus ovatus</i>)	Zhao <i>et al.</i> , 2009

2.2. Modo de transmisión e infección

Aún cuando después de la ingestión oral el patógeno aparece en el estómago antes de extenderse a los órganos internos (Wakabayashi *et al.*, 1977), el modo de transmisión y la vía de infección de esta enfermedad aún no están definidos. Kawahara

(1987) detectó la invasión de *P. damselae* subsp. *piscicida* a través de las branquias usando técnicas de anticuerpos fluorescentes.

Janssen y Surgalla (1968) y Toranzo *et al.* (1982) indicaron que *P. damselae* subsp. *piscicida* no es viable en el medio acuático y necesita de la transmisión directa pez a pez. *P. damselae* subsp. *piscicida* parece ser un organismo muy lábil aunque por otra parte se ha demostrado que cuando las condiciones no son idóneas la actividad metabólica de *P. damselae* subsp. *piscicida* se reduce, aunque mantiene su potencial patógeno en los peces cuando las condiciones vuelven a ser adecuadas (Magariños *et al.*, 1996b).

La patología de la fotobacteriosis está descrita de manera amplia (Romalde, 2002), siendo más frecuente durante los meses de verano, cuando las temperaturas del agua son superiores a 23 °C y cuando la calidad del agua es baja. La diseminación de *P. damselae* subsp. *piscicida* puede ser rápida y sus efectos letales pueden manifestarse en pocos días. Los peces afectados pueden no mostrar lesiones aparentes a excepción de anorexia, oscurecimiento del epitelio, la inflamación en la cavidad peritoneal y en algunas ocasiones ligeras hemorragias. Los cambios patológicos que ocurren en los órganos depende si la enfermedad se muestra en su forma aguda o crónica (Magariños *et al.*, 1996b). En la fase aguda existen pocos cambios patológicos; caracterizándose la enfermedad por la palidez de hígado, riñón y bazo y la presencia de acumulaciones bacterianas. *P. damselae* subsp. *piscicida* se presenta en los órganos de manera aislada o dentro de los fagocitos, en acumulaciones que ocupan los capilares de los órganos ocasionando isquemia local y necrosis focalizada. En la forma crónica de la enfermedad se observaron nódulos blancos de 0,5-3,5 mm de diámetro en los órganos internos (Magariños *et al.*, 1996b), particularmente en riñón y bazo, compuestos por masas de células bacterianas y fagocitos necrotizados con la bacteria intacta en su interior (Romalde, 2002) y es capaz incluso de multiplicarse en su interior (López-Dóriga *et al.*, 2000; Elkamel y Thune, 2003) lo que indicaría la capacidad de *P. damselae* subsp. *piscicida* para sobrevivir dentro de los macrófagos del hospedador.

La enfermedad se combate con dificultad mediante antibióticos, y existen pruebas que los portadores bajo condiciones estresantes pueden sufrir reinfección (Le Breton, 1999).

2.3. Mecanismos de patogenicidad

P. damsela es altamente patógena con importantes mecanismos de virulencia. *P. damsela* subsp. *piscicida* es capaz de invadir tanto macrófagos (Elkamel *et al.*, 2003) como líneas celulares *in vitro* (Elkamel y Thune, 2003) mediante diferentes factores de virulencia (**Tabla 7**). Sin embargo se conoce todavía muy poco de la base molecular de estos factores de virulencia.

Tabla 7. Mecanismos de virulencia de *Photobacterium. damsela* subsp. *piscicida*.

Mecanismo de virulencia	Referencia
Cápsula	Magariños <i>et al.</i> , 1996a; Barnes <i>et al.</i> , 1999
Mecanismos de adherencia	Acosta <i>et al.</i> , 2009
Mecanismos de invasión celular	Acosta <i>et al.</i> , 2006
Mecanismos de secuestro de hierro	Magariños <i>et al.</i> , 1994b; Juiz-Río <i>et al.</i> , 2005; Díaz-Rosales <i>et al.</i> , 2006
Proteínas apoptóticas	do Vale <i>et al.</i> , 2003;2005
Productos extracelulares	Bakopoulos <i>et al.</i> , 2004; Diaz-Rosales <i>et al.</i> , 2006; Naka <i>et al.</i> , 2007; Andreoni y Magnani 2014

La existencia de una cápsula de naturaleza polisacáridica juega un papel importante en la virulencia de los patógenos, incrementando la virulencia.(Magariños *et al.*, 1996a; Barnes *et al.*, 1999). Esta cápsula es dependiente a la presencia de hierro (Magariños *et al.*, 1996a; do Vale *et al.*, 2002).

La adherencia parece estar mediada por un receptor proteico de la superficie de la membrana celular. Experimentos de adherencia *in vitro*, usando diferentes líneas celulares de peces, demostraron que *P. damsela* tiene la capacidad de adherirse e invadir células epiteliales SAF- 1 (Acosta *et al.*, 2009).

La capacidad de las bacterias patógenas para adquirir el hierro es esencial para su crecimiento dentro del hospedador y esencial, por lo tanto, para causar infecciones. *P. damsela* subsp. *piscicida* posee un sistema de adquisición de hierro de alta eficiencia en el hospedador mediante sideróforos. (Magariños *et al.*, 1994b). La importancia del hierro en la virulencia de *P. damsela* subsp. *piscicida* se ha demostrado claramente en infecciones experimentales (Magariños *et al.*, 1994b) y

porque se expresaron ciertas actividades enzimáticas únicamente cuando las cepas se cultivaron en condiciones de restricción de hierro. Se detectó un aumento en la actividad catalasa en medios limitados de hierro por lo que se supone que esta enzima es responsable de la supervivencia de *P. damsela* subsp. *piscicida* dentro del hospedador. (Díaz-Rosales *et al.*, 2006).

Los productos extracelulares (ECP) secretados por patógenos juegan un papel importante en la colonización, invasión y diseminación del patógeno al lisar las células del hospedador e invadir las células adyacentes (Andreoni y Magnani, 2014). Otras funciones que pueden tener los ECP se relacionan con la nutrición bacteriana o como medio que tienen las bacterias para neutralizar los mecanismos de defensa del huésped, provocando reacciones inflamatorias y la necrosis de tejidos. Uno de estos ECP es una exotoxina, la proteína inductora de apoptosis (AIP56), secretada de manera abundante por cepas virulentas de *P. damsela* subsp. *piscicida* y responsable de la apoptosis de macrófagos y neutrófilos. Esta toxina favorece la supervivencia de *P. damsela* subsp. *piscicida* y su posterior diseminación (do Vale *et al.* 2003; 2005).

3. Características generales de *Vibrio harveyi*

Vibrio harveyi ha sido descrita como patógeno para diversos organismos acuáticos (**Tabla 8**) causando importantes pérdidas en acuicultura en amplias zonas geográficas (Liu, P. C. *et al.*, 1997; Austin y Zhang, 2006; Jayasree *et al.*, 2006). Se ha comprobado que este patógeno es difícil de erradicar y el uso intensivo de antibióticos en granjas ha ocasionado el desarrollo de cepas resistentes a los antibióticos (Karunasagar *et al.*, 1994).

3.1. Características morfológicas y bioquímicas

V. harveyi es una bacteria halofílica, Gram negativa, anaerobia facultativa, con un tamaño de 0,5-1,0 μm a 1,2-2,5 μm , y que habita en medios marinos. Puede vivir como comensal asociado a otros seres vivos (Ruby y Morin, 1978), o libre en el agua (Farmer *et al.*, 2005). Se suele encontrar *V. harveyi* en una alta densidad en aguas cálidas en un rango de temperatura de 20 °C a 30 °C (Austin y Zhang, 2006). Su densidad es baja a temperaturas inferiores a 20 °C y las concentraciones más altas se

producen cuando la temperatura del agua está entre 20 y 30 °C (Alavandi *et al.*, 2006; Travers *et al.*, 2008).

Entre sus características están que no produce esporas ni tampoco posee cápsula y tiene un único flagelo polar 2-3 veces mayor que la célula. Debido a la gran diversidad dentro del género *Vibrio*, la identificación bioquímica de *V. harveyi* presenta problemas, por lo que se tiende a la identificación mediante biología molecular (Pang *et al.*, 2010). pudiéndose diferenciar mediante estudios de huella dactilar las cepas patológicas de aquellas que no lo son (Hernandez y Olmos, 2004; Rico *et al.*; 2008).

Tabla 8. Especies hospedadoras de *Vibrio harveyi*.

Espece cultivada	Referencia
Tiburón trozo (<i>Carcharhinus plumbeus</i>)	Bertone <i>et al.</i> , 1996
Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Haldar <i>et al.</i> , 2010
Dentón común (<i>Dentex dentex</i>), dorada (<i>Sparus aurata</i>) y lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Pujalte <i>et al.</i> , 2003
Lenguado senegalés (<i>Solea senegalensis</i>)	Zorrilla <i>et al.</i> , 2003; Rico <i>et al.</i> , 2008
Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) y salmon atlántico (<i>Salmo salar</i>)	Zhang y Austin, 2000
Robalo (<i>Centropomus undecimalis</i>)	Kraxberger-Beatty <i>et al.</i> , 1990
Jurel (<i>Caranx hippos</i>)	Kraxberger-Beatty <i>et al.</i> , 1990
Otros peces	Ishimaru y Muroga ,1997; Lee, K. K. <i>et al.</i> , 2002
<i>Penaeus monodon</i>	Karunasagar <i>et al.</i> , 1994; Liu, P. C. <i>et al.</i> , 1996; Lavilla-Pitogo <i>et al.</i> , 1998; Dechamma <i>et al.</i> , 2015
<i>Penaeus japonicus</i>	Liu, P. C. <i>et al.</i> , 1996
<i>Paralichthys dentatus</i>	Soffientino <i>et al.</i> , 1999; Lee, K. K. <i>et al.</i> , 2002
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Robertson <i>et al.</i> , 1998; Soto-Rodriguez <i>et al.</i> , 2012
<i>Penaeus chinensis</i>	Vandenberghe <i>et al.</i> , 1998
Holoturia (<i>Holothuria scabra</i>)	Becket <i>et al.</i> , 2004
Corales	Sutherland <i>et al.</i> , 2004
Almejas (<i>Ruditapes philippinarum</i>)	Paillard <i>et al.</i> , 2008
Oreja de mar (<i>Haliotis diversicolor</i>)	Nishimori <i>et al.</i> , 1998; Huchette y Clavier, 2004
Ostra de perlas (<i>Pinctada maxima</i>)	Pass <i>et al.</i> , 1987

3.2. Modo de transmisión e infección

La bacteria *V. harveyi* es uno de los agentes causales de la vibriosis. Comenzó a tener importancia como patógeno a finales de la década de los 90 debido a las grandes pérdidas que causó en el cultivo del langostino y otros crustáceos (Prayitno y Latchford, 1995; Lavilla-Pitogo *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 1998; Vandenbегue *et al.*, 1998). La bacteria también ha sido aislada en peces (Zhang y Austin, 2000; Pujalte *et al.*, 2003; Zorrilla *et al.*, 2003; Rico *et al.*, 2008; Haldar *et al.*, 2010), produciendo brotes de la enfermedad durante todo el año, lo que genera grandes pérdidas en la acuicultura. El calentamiento global de los océanos ha ocasionado un aumento en las infecciones de *V. harveyi* (Travers *et al.*, 2008) debido al aumento de la virulencia de los vibrios marinos (Paillard *et al.*, 2004; Gagnaire *et al.*, 2006) y a la dispersión *V. harveyi* fuera del área de distribución conocido (Sganga *et al.*, 2009).

Los peces infectados por vibriosis comienzan padeciendo letargia y pérdida de apetito. Cuando la enfermedad progresa, comienzan a aparecer úlceras y zonas necróticas en la piel, hemorragias en la boca y en la piel, y opacidad en los ojos. La enfermedad termina haciéndose sistémica sin el tratamiento adecuado, sufriendo los peces inflamación y necrosis intestinal, anemia, hemorragias en los músculos y órganos internos, y palidez en el hígado. Los animales pueden también mostrar desorientación. (Grimes *et al.*, 1985; Zorrilla *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2004).

3.3. Mecanismos de patogenicidad

A pesar de la importancia de los mecanismos de virulencia de *V. harveyi*, no se conocen totalmente debido a que existe una gran variabilidad en los mecanismos de virulencia entre diferentes especies hospedadoras y entre las diferentes cepas (Zhang y Austin, 2000; Conejero y Hedreyda, 2004; Austin y Zhang, 2006) (**Tabla 9**).

Se relaciona la patogenicidad de *V. harveyi* con determinados factores de virulencia, siendo uno de los más importantes la secreción de **productos extracelulares** (Zhang y Austin, 2000; Zhang, X. H. *et al.*, 2001; Soto-Rodríguez *et al.*, 2003; Teo *et al.*, 2003; Henke y Bassler, 2004). Probablemente la **hemolisina** es la enzima más ampliamente distribuida entre las cepas patógenas de *V. harveyi*. Las hemolisinas son responsables de romper la membrana del eritrocito, y se encuentran en muchas cepas

patógenas de *V. harveyi* (Zhang, X. H. *et al.*, 2001). La capacidad de unirse al hierro de los tejidos mediante un sistema de **sideróforos** es otro factor de virulencia en *V. harveyi* (Owens *et al.*, 1996).

El **sistema de secreción tipo III** (TTSS) (Henke y Bassler, 2004) está compuesto por varias proteínas que permite la inoculación de determinadas moléculas en el citoplasma de la célula eucariota. Estas moléculas alteran el sistema de transducción de señales en la célula hospedadora para mejorar la supervivencia, la infección o la adhesión bacteriana (Keyser *et al.*, 2008; Stavrínides *et al.*, 2008). Además el sistema TTSS causa la inflamación y la alteración del citoesqueleto.

Se han identificado otros factores de virulencia como **bacteriocinas** y los **lipopolisacáridos**. Tanto McCall y Sizemore (1979) y Prasad *et al.*, (2005) lograron caracterizar bacteriocinas en *V. harveyi*. El lipopolisacárido (LPS) es un antígeno de superficie de la membrana externa de las Gram negativas, actuando como endotoxina (Raetz y Whitfield, 2002) con capacidad citotóxica, proteolítica y hemolítica en *V. harveyi* (Montero y Austin, 1999).

El **biofilm** bacteriano es un sistema de defensa contra los agentes antimicrobianos (Costerton *et al.*, 1999) y actúa también como sistema para absorber moléculas orgánicas cercanas de manera más eficaz (Decho, 2000), lo que explica que *Vibrio* spp. ocupe de manera eficaz una gran cantidad de nichos ecológicos (Costerton *et al.*, 1987). La persistencia de *V. harveyi* en los sistemas de acuicultura se debe a la formación de biofilms con resistencia a desinfectantes y antibióticos (Karunasagar *et al.*, 1994).

Una de las formas de regulación de los factores de virulencia es mediante el mecanismo de *quorum sensing*, un sistema de comunicación entre células que sirve para regular la expresión génica en base a la concentración celular en el medio (Ruwandeeepika *et al.*, 2012; Soni *et al.*, 2015). El sistema *quorum sensing* regula varios factores de virulencia como son las toxinas extracelulares (Manefield *et al.*, 2000), metaloproteasas (Mok *et al.*, 2003; Ruwandeeepika *et al.*, 2011), sistema de secreción tipo III (Henke y Bassler, 2004), y fosfolipasas (Natrah *et al.*, 2011).

Tabla 9. Factores de virulencia de *V. harveyi*.

Mecanismo de virulencia	Referencia
Productos extracelulares	Zhang y Austin, 2000; Zhang, X. H. <i>et al.</i> , 2001; Soto-Rodríguez <i>et al.</i> , 2003; Teo <i>et al.</i> , 2003; Henke y Bassler, 2004
Sistema de secreción tipo III	Henke y Bassler, 2004
Habilidad de formar biofilms	Karunasagar <i>et al.</i> , 1994
Capacidad de unirse al hierro	Owens <i>et al.</i> , 1996
Bacteriocinas	McCall y Sizemore, 1979; Prasad <i>et al.</i> , 2005
Lipopolisacárido	Montero y Austin, 1999; Baffone <i>et al.</i> , 2001

4. El uso de antibióticos en acuicultura frente a las enfermedades bacterianas y su impacto

Uno de los retos que presenta la acuicultura global es la minimización de su impacto en el medio natural (Allsopp, 2008), entre ellos evitar el exceso de pienso y desechos provenientes de la acuicultura, y disminuir el uso de antibióticos para el control de enfermedades infecciosas.

Debido a la intensificación de la acuicultura, durante las últimas décadas los antibióticos se han usado como estrategia tradicional para el tratamiento y prevención de las patologías de peces. Sin embargo esto ha provocado la propagación de microorganismos resistentes a antibióticos que pueden ser transmitidos desde el medio acuático al hombre (Van den Bogaard y Stobberingh, 2000; Kim, S. R. *et al.*, 2004; Akinbowale *et al.*, 2006; Cabello, 2006). También se ha incrementado la entrada de bacterias que puedan transmitir plásmidos de resistencia de antibióticos a patógenos que infectan al hombre (FAO, 2005). Por otra parte los antibióticos inhiben o destruyen microbiota beneficiosa tanto el ecosistema gastrointestinal como en el ambiente acuático. Los residuos de los antibióticos se acumulan en los productos acuícolas y son perjudiciales para el consumo humano (OMS, 2006). Debido a todos estos problemas asociados a los antibióticos, los gobiernos han introducido legislaciones más restrictivas en el uso de antibióticos para la producción animal: la Unión Europea y Estados Unidos han implementado prohibiciones en el uso de antibióticos (Kesarcodi-Watson *et al.*,

2008) y en los países asiáticos, aunque existe menos control en el uso de antibióticos, están siendo presionados a través del mercado internacional.

Una de las vías para la disminución del uso de antibióticos es mejorar las condiciones de vida de los peces. Muchos de los patógenos que afectan a la acuicultura son en su mayor parte oportunistas que solamente causan la enfermedad cuando el organismo está inmunodeprimido o estresado (Iturria *et al*, 2015), por lo que eliminar las causas del estrés son también un factor importante que puede reducir las infecciones (Tort, 2011). Esto podría lograrse mediante la mejora de la calidad del agua, evitando una alta densidad en los tanques almacenamiento, y mejorando la manipulación (Brock y Bullis, 2001). Sin embargo, no siempre es económicamente viable el cultivo de peces en las mejores condiciones por lo que siempre habrá riesgo de infección y es necesaria la aplicación de técnicas de biocontrol eficaces.

Para combatir las enfermedades y prevenir la dependencia y abuso a los antibióticos, hoy en día se promueven estrategias alternativas como la prevención a través de la mejora de la gestión de las instalaciones de cultivo de peces y aumentar la resistencia a las enfermedades mediante la activación de la respuesta inmune del pez mediante el uso de vacunas, inmunoestimulantes (sustancias de origen bacteriano, fúngico, animal o vegetal) (Sakai, 1999) y la introducción de probióticos como agentes de control biológico (Panigrahi y Azad, 2007).

5. Vacunación

En general, los peces que sobreviven a una infección muestran posteriormente una mayor protección ante una segunda infección. Por tanto, el principal objetivo de la vacunación es imitar este proceso, el de la inmunidad adaptativa, con la aparición de células de memoria y anticuerpos específicos.

La vacunación en peces tiene una larga historia pero es desde hace 20 años cuando la vacunación se ha establecido como una medida profiláctica básica (Van Muiswinkel *et al.*, 2008). Esto ha permitido la reducción tanto de la mortalidad como del uso de antibióticos en las piscifactorías. La vacunación se usa de manera rutinaria en un amplio espectro de especies de acuicultura (**Tabla 10**), existiendo vacunas

disponibles para más de la mitad de las principales patologías virales y bacterianas en acuicultura (Somerset *et al.*, 2005).

Tabla 10. Disponibilidad de vacunas comerciales frente a los principales patógenos en acuicultura (Pridgeon y Klesius, 2012).

Enfermedad	Patógeno	Peces
Vibriosis	<i>Vibrio angillarum</i> <i>Vibrio ordali</i>	Salmónidos, bacalao, dorada, peces planos, lubina y seriola
Vibriosis de agua fría	<i>Vibrio salmonicida</i>	Salmónidos
Úlcera invernal	<i>Moritella viscosa</i>	Salmónidos
Furunculosis	<i>Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida</i>	Salmónidos
Furunculosis atípica	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Salmónidos
Yersiniosis	<i>Yersinia ruckeri</i>	Salmónidos
Piscirickettsiosis	<i>Piscirickettsia salmonis</i>	Salmónidos
Enfermedad de la branquia	<i>Flavovacterium branchiophylum</i>	Salmónidos
Flavobacteriosis	<i>Flavovacterium psychrophilum</i>	Salmónidos
Enfermedad columnar	<i>Flavovacterium columnare</i>	Salmónidos y pez gato
Septicemia entérica	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	Pez gato
Edwardsiellosis	<i>Edwardsiella tarda</i>	Tilapia
Enfermedad bacteriana renal	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	Salmónidos
Lactococosis	<i>Lactococcus garvieae</i>	Trucha y peces planos
Fotobacteriosis	<i>Photobacterium damsela subsp. piscicida</i>	Dorada, lubina y peces planos
Estreptococosis	<i>Streptococcus iniae</i> <i>Streptococcus phocae</i>	Trucha, tilapia, dorada y salmónidos

5.1. Clasificación de las vacunas según la composición

Se han utilizado distintos diseños de inmunización de los peces, variando tanto la composición de la vacuna como su vía de administración. Así en base a su composición se pueden diferenciar en:

Vacunas inactivadas. Se obtienen por inactivación de las células mediante el uso de agentes desnaturizantes, como el calor o el formol. Son la forma más simple y barata de vacunar peces y se comenzaron a utilizar para inmunizar mediante inmersión y más tarde para inmunizar mediante inyección. Cuando estas vacunas se administran por vía intraperitoneal con un adyuvante se mejora la presentación del antígeno ante las células del sistema inmunitario mejorando así la protección del pez (Cox y Coulter, 1997). Como efectos secundarios puede existir un oscurecimiento de los tejidos donde se ha inyectado la vacuna o la formación de lesiones en la cavidad peritoneal debido a la administración del adyuvante (Afonso *et al.*, 2005; Mutoloki *et al.*, 2006; Aunsmo *et al.*, 2008; Treasurer y Cox, 2008). Otras desventajas que presentan estas vacunas es que la vacuna puede perder inmunogenicidad al perder su conformación antigénica, estimulando al sistema inmunitario de manera más débil que otras vacunas como por ejemplo, las vacunas vivas (Criado *et al.*, 2008).

Vacunas basadas en la tecnología molecular. Se basan en el uso de antígenos puros o proteínas recombinantes, principalmente producidas en *Escherichia coli*, o en la inyección intramuscular de plásmidos de DNA codificantes de un antígeno de interés.

Las vacunas de DNA se usan como método de defensa frente patógenos, principalmente virus y bacterias intracelulares, y patógenos de cultivo difícil o peligrosos en el laboratorio. (Pasnik y Smith 2005; Kumar *et al.*, 2007; Gillund *et al.*, 2008; Secombes, 2008; Tonheim *et al.*, 2008). Como principal desventaja se encuentra que en algunos países los peces tratados con vacunas de DNA se identifican como “organismos modificados genéticamente”. Ciertos experimentos han mostrado que la vacuna DNA no se degrada completamente en el sitio de la inyección con el riesgo de contaminar a otros peces (Lorenzen *et al.*, 2005; Sommerset *et al.*, 2005; Kurath *et al.*, 2006; Gillund *et al.*, 2008).

Para la producción de vacunas de antígenos puros se utilizan organismos como productores de antígenos específicos al introducirles el ADN que codifica dicho antígeno. Este método de vacunación requiere información del organismo que producirá

las proteínas antigénicas y que este organismo no transfiera ningún tipo de material genético (Clark y Cassidy-Hanley, 2005; Brun *et al.*, 2011)

Vacunas vivas atenuadas. Se trata de un método efectivo de vacunación (Shoemaker *et al.*, 1999). Consiste en el uso de cepas vivas avirulentas o atenuadas. Al exponer a los peces a suspensiones vivas de bacterias se consiguen niveles aceptables de protección al contener esta vacuna los determinanes antigénicos necesarios (Norqvist *et al.*, 1989). El patógeno atenuado es capaz de sobrevivir y replicarse dentro del hospedador, lo que genera una respuesta inmunitaria importante que confiere una protección de larga duración (Clark y Cassidy-Hanley, 2005; Clutterbuck, 2015).

El uso de vacunas vivas no es nuevo pues la primera vacuna que protegió a los humanos provenía de un virus vivo en el siglo XVIII (Stewart y Devlin, 2006). De manera tradicional, la atenuación se ha conseguido mediante múltiples pases del microorganismo en el medio adecuado de crecimiento lo que resulta en mutaciones aleatorias que conllevan a la atenuación (Itano *et al.*, 2006). Otras formas de obtener vacunas vivas o atenuadas es usar bacterias que se encuentran en el medioambiente y que tienen una estructura antigénica similar al patógeno (Salonius *et al.*, 2005), mediante la mutagénesis química o física (Shoemaker *et al.*, 2007), o mediante técnicas de biología molecular que eliminan genes de virulencia o modifican rutas metabólicas (Daly *et al.*, 2001; Salonius *et al.*, 2005).

La principal ventaja de estas vacunas es que estimulan de manera importante la respuesta inmunitaria, tanto humoral como celular, debido a que la vacuna viva es capaz de sobrevivir dentro del organismo (Clark y Cassidy-Hanley, 2005). Una de las mayores desventajas de las vacunas atenuadas es que pueden ser menos seguras que las vacunas inactivadas y es necesario asegurar que el organismo atenuado no revierta a su forma virulenta, provocando la enfermedad en el animal vacunado. También es importante evitar que la vacuna no sea liberada al medio ambiente, por lo que se debe seguir un estricto protocolo de seguridad (Frey, 2007). Esto supone un aumento en el coste de producción de vacunas atenuadas (Babiuk *et al.*, 2000).

5.2. Vías de administración de la vacuna

No solo la composición de la vacuna es importante para su efectividad. La vía de administración determina tanto su efectividad y coste del tratamiento. En acuicultura la administración de las vacunas se realiza fundamentalmente de manera oral (introducida en la comida), mediante inmersión (diluida en agua) o por inyección.

Inyección

Se inmuniza el pez mediante inyección intraperitoneal o por vía intramuscular (vía exclusiva para vacunas de DNA). La inyección de la vacuna supone un índice de protección mayor que cualquier otro método (Lillehaug, 1989; Magnadottir, 2010). Se han vacunado una gran variedad de especies de esta manera durante años con el principio de inyectar la vacuna consiguiendo proteger al pez durante un largo tiempo. Y como no existe la limitación del volumen como ocurre en la vacunación por inmersión es la vía utilizada para peces grandes (Lillehaug, 1989).

Este tipo de vacunación es lenta: requiere de una mayor mano de obra y se inmuniza a un menor número de peces en comparación con otras técnicas porque cada pez se maneja de manera individual y es necesaria la anestesia para facilitar el manejo del pez. Además es un método estresante: se puede dañar el epitelio favoreciendo infecciones secundarias como bacterias y hongos; dañar órganos vitales como la vejiga natatoria, e incluso ocasionar enfermedades relacionadas con el estrés. Los peces no pueden comer durante varios días antes de la vacunación y es preciso esperar uno o varios días para que el pez vuelva a alimentarse, con el perjuicio del crecimiento del pez. Además aumenta el peligro de que exista un accidente con la propia manipulación (National Office of Animal Health, 2006).

Se han desarrollado máquinas que eliminan la exposición del trabajador a la vacuna y minimizan el estrés del pez, pero todavía se requiere de personal que examine el proceso de vacunación, como por ejemplo comprobando que la inyección se realiza sin problemas o que el pez vuelve a comer. Un operario con experiencia es capaz de vacunar hasta 3.500 peces por hora mientras que existen máquinas que pueden vacunar hasta 20.000 peces por hora (Skala Maskon 2015).

Inmersión

Este método continúa siendo el más eficaz para proporcionar una inmunidad a corto plazo en peces pequeños y sobre todo por facilitar su manejo. En las vacunas por inmersión suelen usarse bacterias inactivadas en formalina o bacterias vivas. El procedimiento de vacunación de antígenos inactivados se realizan por una exposición corta en suspensiones concentradas de antígenos (Método por inmersión directa) o en exposiciones más largas en un baño más diluido (Método por baño).

Mediante inmersión directa se usa la vacuna poco diluída, en periodos muy cortos (de segundos o minutos) y con abundante aireación. El método de la inmersión directa es el que se usa de manera más amplia, es económico para peces pequeños (hasta 15 g) y es muy rápida (30-120 s). La principal limitación de la vacunación por inmersión es la debida al tamaño de los peces. Aunque la inmersión supone una protección menor que por inyección, los niveles de protección son todavía altos (Lillehaug, 1989). Una modificación de la inmersión directa es el método de inmunización por baño en el que los peces son vacunados en suspensiones más diluidas de las vacunas desde 20 min a varias horas. Esta se suele realizar reduciendo el nivel del agua del tanque y aumentando la oxigenación. En la vacunación por baño la manipulación del pez es menor que en la vacunación por inmersión, eliminándose completamente el estrés. Debido a este motivo es el método ideal de vacunación, aunque el nivel y duración de la inmunidad no es tan grande como en otros procedimientos (Lillehaug, 1989). Sin embargo, como ocurre con la inmersión, el principal problema son los residuos de vacuna que pueden quedar en el tanque, o el uso de una dilución no adecuada.

Administración oral

La vacunación oral a través del pienso es en principio el método ideal para la administración de una vacuna. La eficacia de la vacuna oral depende de su concentración en la comida (Gravningen, 1998a), la resistencia frente a la degradación en el digestivo y de la absorción de los antígenos en el intestino. Por tanto, el volumen de antígeno requerido para este método es mucho mayor que el requerido para la vacunación por inyección.

La vacuna se añade al pienso emulsionadas en aceite o englobadas con el alimento mediante microencapsulación. De esta forma se asegura su paso por el tracto

intestinal sin la degradación ácida del estómago, aunque en el caso del sistema digestivo de *Solea senegalensis* es más alcalino que en otros teleosteos (Yúfera y Darias, 2007). Si la vacuna se administra dentro del pienso se debe tener en cuenta que los antígenos deben resistir las temperaturas y presiones extremas que se alcanzan en la producción de estos piensos.

Debido a que no se usan adyuvantes para prolongar la presentación de los antígenos por vía oral, la respuesta inmune es corta y la protección es menor a los valores obtenidos mediante inyección o inmersión. Por este motivo se suele reservar este método de inmunización como refuerzo para mejorar una vacunación (Vendrell *et al.*, 2004; Brudeseth *et al.*, 2013).

5.3. El uso de vacunas frente a en *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* y *Vibrio harveyi*

P. damsela subsp *piscicida* tiene un periodo de infección intracelular dentro de los macrófagos, esta es la razón de la ineficacia de los antibióticos y la profilaxis en el tratamiento de los brotes de fotobacteriosis (Romalde *et al.*, 2002). Por tanto, la vacunación se convierte en la mejor forma para controlar la enfermedad (Arijo *et al.*, 2005b). Las diferentes cepas de *P. damsela* subsp *piscicida* son séricamente muy homogéneas lo que facilita la obtención de una vacuna. Existen en la actualidad vacunas frente *P. damsela* subsp *piscicida* (**Tabla 11**) aunque su eficacia depende de la especie del pez, el tamaño, la formulación de la vacuna y la sintomatología de la enfermedad (Romalde y Magariños, 1997; Le Breton, 2009). Por ejemplo la vacunación en lubinas es más eficaz en peces con un peso entre 0,5 y 2 g. (Magariños *et al.*, 1994c). A pesar de los avances conseguidos, la protección todavía sigue siendo corta en el tiempo (Le Breton, 2009).

El control de las vibriosis mediante vacunación se usa ampliamente en crustáceos (Alabi *et al.*, 1999; Press y Lillehaug, 1995) aunque en peces existen pocos estudios (**Tabla 12**).

Tabla 11. Vacunas existentes para *P. damsela* subsp *piscicida*. (i.p., inyección intraperitoneal; i.m., inyección intramuscular) (adaptada de Andreoni *et al.*, 2014).

Composición	Tipo de vacuna	Via de inoculación	Especie	Referencia
Bacterina inactivada mediante formalina, sobreexpresando 97kDa OMP y 52kDa ECP	Inactivada	Baño	Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Barnes <i>et al.</i> , 2005
Bacterina inactivada mediante formalina y enriquecida con ECP	Inactivada	Baño	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Magariños <i>et al.</i> , 1994c
Bacterina inactivada mediante formalina y enriquecida con LPS de <i>Escherichia coli</i>	Inactivada	Baño	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Hanif <i>et al.</i> , 2005
Bacterina inactivada con formalina y enriquecida con ECP. También se evaluó de manera bivalente	Inactivada	Baño, i.p.	Lenguado (<i>Solea senegalensis</i>)	Arijo <i>et al.</i> , 2005b
Bacterina inactivada con formalina, enriquecida con ECP y cápsula polisacáridica	Inactivada	Baño, oral, i.p.	Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Bakopoulos <i>et al</i> 2003
Bacterina inactivada mediante formalina y calor	Inactivada	Baño y oral	Seriola (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	Fukuda y Kusuda 1981, Hamaguchi y Kusuda 1989, Kusuda y Salati 1993.
Bacterina inactivada con formalina. Vacuna bivalente	Inactivada	Baño e i.p.	Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Gravningen <i>et al.</i> , 1998
Bacterina inactivada con cloroformo y enriquecida con ECP LPS	Inactivada	i.p.	Seriola (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	Kawakami <i>et al.</i> , 1997
Vacuna viva atenuada	Cepa atenuada	Baño	Seriola (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	Kusuda y Hamaguchi 1988
Vacuna viva atenuada mutante aroA	Cepa atenuada	Baño o i.p.	Híbrido de lubina rayada atlántica (<i>M. chrysops</i> x <i>M. saxatilis</i>)	Thune <i>et al.</i> , 2003
LPS	Recombinante de subunidades	Baño	Seriola (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	Fukuda y Kusuda 1985
Lipoproteína	Recombinante de subunidades	i.p.	Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Andreoni <i>et al.</i> , 2013

Tabla 11 (cont.)				
Composición	Tipo de vacuna	Via de inoculación	Especie	Referencia
Antígenos rHSP60, rENOLASE, y rGAPDH	Recombinante de subunidades	i.p.	Cobia (Rachycentron canadum)	Ho <i>et al.</i> , 2011, Ho <i>et al.</i> , 2014
Antígenos ribosomales	Recombinante de subunidades	i.p.	Seriola (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	Kusuda <i>et al.</i> , 1988
Proteína extracelular 55 kDa	Recombinante de subunidades	i.p.	Lenguado (<i>Solea senegalensis</i>)	Dos Santos <i>et al.</i> , 2013
Antígeno recombinante	DNA	i.m.	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Kato <i>et al.</i> , 2015
Antígeno recombinante	DNA	i.p.	Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Andreoni <i>et al.</i> , 2013

Los estudios sobre vacunación en el lenguado senegalés se han centrado en el uso de una vacuna divalente frente *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi* enriquecida en ECP inactivada por formalina (Arijo *et al.*, 2005b). Esta fórmula condujo a niveles de protección después de 4 meses de la vacunación cercanos al 75 %, después de los cuales el beneficio decayó. Por otra parte también se ha observado que los componentes subcelulares de *V. harveyi*, como ECP y OMP, pueden activar la respuesta inmune (Arijo *et al.*, 2008).

Tabla 12. Vacunas existentes para *V. harveyi* (i.p., inyección intraperitoneal; i.m., inyección intramuscular).

Composición	Tipo de vacuna	Vía de inoculación	Especie	Referencia
Bacterina inactivada con formalina	Inactivada	Baño	Camarón hindú (<i>Penaeus indicus</i>)	Alabi <i>et al.</i> , 1999
Bacterina inactivada con formalina	Inactivada	Oral	Camarón patiblanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Powell <i>et al.</i> , 2011
Bacterina inactivada con formalina y encapsulada en liposoma	Inactivada	Oral	Mero (<i>Epinephelus bruneus</i>)	Harikrishnan <i>et al.</i> , 2012
Bacterina inactivada con formalina	Inactivada	i.p.	Perga gigante (<i>Lates calcarifer</i>)	Crosbie y Nowak, 2004
Bacterina inactivada con formalina enriquecida en ECP. También se evaluó de manera bivalente	Inactivada	Baño e i.p.	Lenguado (<i>Solea senegalensis</i>)	Arijo <i>et al.</i> , 2005b
Bacterina inactivada con formalina enriquecida en ECP.	Inactivada	Oral e i.p.	Lenguado (<i>Solea senegalensis</i>)	Arijo <i>et al.</i> , 2008
Proteína extracelular DegQ	Recombinante de subunidades	Oral, baño o i.p.	Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Hu <i>et al.</i> , 2011a
Proteína de membrana externa OmpK y GADPH	Recombinante de subunidades	i.p.	Corvina (<i>Pseudosciaena crocea</i>)	Zhang, C. <i>et al.</i> , 2008
Proteína de membrana externa OmpN	Recombinante de subunidades	i.p.	Mero (<i>Epinephelus coioides</i>)	Pang <i>et al.</i> , 2010
Proteasa Vhp1	Recombinante de subunidades / Vacuna Viva	i.p.	Lenguado japonés (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Cheng, S. <i>et al.</i> , 2010
Proteína de membrana externa Vhhp2	Recombinante de subunidades	i.p.	Lenguado japonés (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Sun, K. <i>et al.</i> , 2009
Proteína de membrana externa OmpK	Recombinante de subunidades	i.p.	Mero (<i>Epinephelus coioides</i>)	Ningqiu <i>et al.</i> , 2008
Antígeno recombinante	DNA	i.p.	Lenguado japonés <i>Paralichthys olivaceus</i>	Hu y Sun, 2011a

5.4. Limitaciones del proceso de vacunación

A pesar de que el uso de vacuna se ha demostrado como uno de los métodos más exitosos en la prevención de enfermedades infecciosas, no deja de carecer limitaciones. Una de las líneas de investigación es la mejora de la eficiencia de vacunación ante enfermedades emergentes y patologías persistentes, pero esta se ve lastrada por el coste económico que supone este campo de estudio. No solo se necesita mejorar la calidad de la vacuna, sino también mejorar el mecanismo de administración, aumentando al mismo tiempo el bienestar del pez (por ejemplo, con una menor manipulación) (Brudeseth *et al.* 2013). Otra desventaja es el hecho que las vacunas no pueden ser usadas de manera universal como control de enfermedades: existen patologías sin una vacuna eficaz, el sistema inmune se desarrolla parcialmente en los peces jóvenes (huevos, alevines, larvas), y los moluscos y crustáceos son difíciles de vacunar (Sommerset *et al.*, 2005).

Debido a estas deficiencias, en los últimos años se ha hecho énfasis en la búsqueda de otros métodos alternativos que sustituya, o bien complementen, los procesos de inmunización mediante el uso de vacunas. Entre estos métodos alternativos está el uso de microorganismos probióticos.

6. Probióticos

En el tratamiento y sobretodo, la prevención de enfermedades ha aumentado el interés por nuevas estrategias en la alimentación y la salud animal (Balcázar *et al.*, 2008; Panigrahi *et al.*, 2010), además que se ha incrementado la demanda mundial por una acuicultura más respetuosa con el medioambiente (Abdelhamid *et al.*, 2009), potenciándose el uso de probióticos y sustancias inmunomoduladoras como prebióticos, simbióticos y fitobioticos (Merrifield *et al.*, 2010b).

El concepto de probiótico acuático es relativamente nuevo, existiendo varias definiciones (Gatesoupe, 1999; Vershuere *et al.*, 2000; Irianto y Austin, 2002a). La más reciente está enunciada por Merrifield *et al.* (2010b) que lo define como *microorganismo vivo, inactivado o alguno de sus componentes que administrado mediante la alimentación o mediante al agua beneficia al hospedador mejorando la resistencia ante la enfermedad, el crecimiento, la utilización del alimento, la respuesta ante el estrés o la salud en general; a través de la mejora del equilibrio microbiológico en el hospedador o en el medio ambiente.*

Cuando se buscan probióticos para usar en el medio acuático es importante considerar ciertos factores que serán diferentes si buscamos probióticos para animales terrestres. Los animales acuáticos tienen una relación estrecha con el medio externo, y los microorganismos, que son capaces de mantenerse en el medio externo del animal y proliferar de manera independiente al hospedador (El-Haroun *et al.*, 2006), son captados por el animal de manera constante por procesos de osmoregulación y alimentación (Lara-Flores, 2011). Por tanto la composición de la comunidad microbiana puede ser influenciada por las condiciones en las que viva el pez y esta microbiota puede ser modificada con la ingestión de otros microorganismos. Esta modificación de la comunidad microbiana constituye una herramienta viable para reducir o eliminar la incidencia de patógenos oportunistas (Balcázar, 2007a). Uno de los objetivos más importante en el uso de probióticos es mantener o establecer una relación beneficiosa entre microorganismos patógenos y beneficiosos en la microbiota intestinal o en el mucus del epitelio de los animales acuáticos.

6.1. El uso de probióticos en acuicultura

Los probióticos pueden proporcionar una protección amplia e inespecífica frente a enfermedades (Rengpipat *et al.*, 2000; Panigrahi y Azad, 2007). Su uso en nutrición animal y humana está bien documentada (Rinkinen *et al.*, 2003) y son aplicados en acuicultura (Gomez-Gil *et al.*, 2000; Sharma y Bhukhar, 2000; Verschueren *et al.*, 2000; Irianto y Austin, 2002a; Vine *et al.*, 2006; Wang, Y. B., 2007) (**Tabla 13**).

Tabla 13. Especies acuícolas en las que se han aplicado probióticos y los factores que cambian tras dicha aplicación. SI: sistema inmunitario; C: crecimiento. Hi: histología; RE: resistencia al estrés; RI: resistencia a la infección; Mi: microbiota intestinal. M: metabolismo; He: hematología; H: niveles de hormonas; E: actividades enzimáticas; De: desarrollo.

Espece cultivada	Probiótico	Factor	Referencia
<i>Anguila japonica</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i> PL11	RI	Lee <i>et al.</i> , 2013
<i>Catla catla</i> PTB16	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	RI	Das <i>et al.</i> , 2013
	<i>Bacillus circulans</i> PB7	C, M, SI	Bandyopadhaya y Mohapatra, 2009
<i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	C	Franke <i>et al.</i> , 2013
	<i>Lactobacillus casei</i>	SI, RI	Lamari <i>et al.</i> , 2013
	<i>Pediococcus acidilactici</i>		

Tabla 13 (cont.)			
Especie cultivada	Probiótico	Factor	Referencia
<i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>Vagococcus fluvialis</i>	RI SI	Sorroza <i>et al.</i> , 2012; 2013 Román <i>et al.</i> , 2012; 2013
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	SI	Tovar-Ramirez <i>et al.</i> , 2010
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	SI	Abelli <i>et al.</i> , 2009 Picchieti <i>et al.</i> , 2009
<i>Epinephelus coioides</i>	<i>Bacillus</i> sp	C, SI	Sun <i>et al.</i> , 2010
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	C, SI, RI	Son <i>et al.</i> , 2009
<i>Gadus morhua</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. (GP21) <i>Psychrobacter</i> sp.(GP12)	SI	Lazado y Caipang, 2011
	<i>Phaeobacter</i> ssp	RI	D'Alvise <i>et al.</i> , 2013
	<i>Arthrobacter</i> sp. <i>Enterococcus</i>	RI, Mi, C	Lauzón <i>et al.</i> , 2009; 2010
	<i>Vibrio</i> sp. <i>Microbacterium</i> <i>Ruegeria</i> <i>Pseudoalteromonas</i>	RI	Fjellheim <i>et al.</i> , 2010
<i>Labeo rohita</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> VSG-3	C, RI, SI	Giri <i>et al.</i> , 2013
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VSG-2	RI, SI	Giri <i>et al.</i> , 2016
	<i>Multispecies</i> (BF + <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Lactococcus lactis</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	RE	Mohapatra <i>et al.</i> , 2012
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Enterobacter</i> sp.	RI	LaPatra <i>et al.</i> , 2014
	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>tolerans</i>	C, M	López-Cazorla <i>et al.</i> , 2014
	<i>Kocuria</i> SM1 y <i>Rhodococcus</i> M2	C, M, RE	Sharifuzzaman <i>et al.</i> , 2014

Tabla 13 (cont.)			
Espece cultivada	Probiótico	Factor	Referencia
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Bacillus</i> sp. <i>Pediococcus</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp.	C	Ramos <i>et al.</i> , 2013
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Mi	Anderson, 2013
	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	SI, RI	Pérez-Sánchez <i>et al.</i> , 2011
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	SI	Panigrahi <i>et al.</i> , 2011
	<i>Kocuria</i> SM1 <i>Rhodococcus</i>	SI	Sharifuzzaman <i>et al.</i> , 2011
	<i>Kocuria</i>	SI, RI	Sharifuzzaman y Austin, 2010
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	He	Panigrahi <i>et al.</i> , 2010
	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> y <i>Enterococcus faecium</i>	Mi, SI M	Merrifield <i>et al.</i> , 2010a
	<i>Bacillus mojavensis</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	RI	Capkin y Altinok, 2009
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	C, RI	Pooramini <i>et al.</i> , 2009
	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Pediococcus acidilactici</i>	C	Giannenas <i>et al.</i> , 2015
	<i>Aeromonas sobria</i>	SI, RI	Arijo <i>et al.</i> , 2008
	<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	SI
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> WL-APD911		C, SI	Chiu y Liu., 2014
<i>Pediococcus acidilactici</i>		SI	Standen <i>et al.</i> , 2013
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		C	Abu-elala <i>et al.</i> , 2013
<i>Bacillus</i> sp.		SI	Del'Duca <i>et al.</i> , 2013

Tabla 13 (cont.)			
Especie cultivada	Probiótico	Factor	Referencia
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	C, RI	Wang, J. T. <i>et al.</i> , 2013
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Bacillus subtilis</i> C-3102 <i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> JCM 1149	SI, Mi	Ren <i>et al.</i> , 2013
	<i>Bacillus subtilis</i> C-310	SI, Mi, H	He <i>et al.</i> , 2013
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Hi, SI, Mi	Pirarat <i>et al.</i> , 2011
	<i>Lactococcus lactis</i>	RI, SI	Zhou <i>et al.</i> , 2010
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	RI	Ngamkala <i>et al.</i> , 2010
	Biogen® <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (DVAQUA)	C, M, He C, Mi, SI	Mehrim, 2009 He <i>et al.</i> , 2009
<i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	C, SI	Heo <i>et al.</i> , 2013
	<i>Bacillus</i> sp.	C, SI, RI	Cha <i>et al.</i> , 2013
	<i>Lactococcus lactis</i> BFE920	SI, RI, M	Kim y Kim, 2013
	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> y <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	SI	Harikrishnan <i>et al.</i> , 2011
<i>Salmo salar</i>	<i>Methylococcus capsulatus</i>	Hi	Romarheim <i>et al.</i> , 2013
	Bacterias ácido lácticas	Hi, Mi	Navarrete <i>et al.</i> , 2013
	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	RI	Ibrahim y Vesterlund, 2014
<i>Solea senegalensis</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	C, De	Lobo <i>et al.</i> , 2010, 2014
	<i>Bacillus</i> sp. <i>Pedicoccus</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp.	RI	Batista <i>et al.</i> , 2013

Tabla 13 (cont.)			
Especie cultivada	Probiótico	Factor	Referencia
<i>Solea senegalensis</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Shewanella baltica</i>	RI	García de la Banda <i>et al.</i> , 2010
	<i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Shewanella baltica</i>	SI, RI	Díaz-Rosales <i>et al.</i> , 2009
<i>Solea solea</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	RI, C, RE	Avella <i>et al.</i> , 2011
	<i>Enterococcus faecium</i> IMC511	H	Palermo <i>et al.</i> , 2011
	<i>Bacillus subtilis</i> C-3102	C, M, Mi	He <i>et al.</i> , 2011
	<i>Lactobacillus</i> sp.	Mi	Chandra y Rajan, 2009
	<i>Bacillus subtilis</i>	C	El-Nobi <i>et al.</i> , 2009
<i>Salmo trutta</i>	<i>Lactococcus lactis</i> CLFP100 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> CLFP196	RI	Balcázar <i>et al.</i> , 2009
<i>Sparus aurata</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 <i>Bacillus</i> sp.	SI	Esteban <i>et al.</i> , 2014
	<i>Shewanella putrefaciens</i>	C	Guzmán-Villanueva <i>et al.</i> , 2014
	<i>Bacillus</i> sp.	C, E	Arig <i>et al.</i> , 2013
	<i>Bacillus subtilis</i>	Hi, Mi, SI	Cerezuela <i>et al.</i> , 2013a,b
	<i>Vagococcus fluvialis</i>	SI	Román <i>et al.</i> , 2013
	<i>Vagococcus fluvialis</i>	SI	Román <i>et al.</i> , 2012
	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	C, RE, SI, Mi	Varela <i>et al.</i> , 2010 Cordero <i>et al.</i> , 2013
	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> + <i>Bacillus</i> <i>pumilus</i>	RE	Avella <i>et al.</i> , 2010
	<i>Lactobacillus fructivorans</i> + <i>Lactobacillus plantarum</i>	SI	Abelli <i>et al.</i> , 2009

6.2. Criterios de selección de probióticos

La selección de probióticos es un proceso crítico porque una selección de cepas no adecuada puede ocasionar efectos indeseables en el hospedador (Lara-Flores, 2011). Se han establecido ciertos criterios para considerar a un microorganismo como probiótico (Merrifield *et al.*, 2010a) discriminándose características esenciales y características no esenciales, pero favorables. Cuantas más características sean cumplidas por el microorganismo más adecuado se considerará su uso como probiótico.

Características esenciales

- No perjudicial, tanto para el animal de interés como para el medio ambiente y los consumidores finales. Todas las cepas no deben causar efectos indeseables cuando se administran.
- Libre de plásmidos codificantes de genes de resistencia a antibióticos.
- Resistente a sales biliares y a pH bajo.

Características favorables

- Capaz de adherirse y crecer en el moco intestinal.
- Poder colonizar la superficie del epitelio intestinal.
- Tener características favorables de crecimiento (por ejemplo, una fase lag corta o crecer en la misma temperatura que el hospedador).
- Poseer capacidad antagonista frente uno o más patógenos.
- Producción de enzimas digestivas extracelulares (por ejemplo, celulasa si la dieta es rica en componentes vegetales) o producir vitaminas.
- Debe ser nativo del hospedador o del medio.
- Debe conservar sus propiedades probióticas en condiciones de almacenamiento, y tras los procesos industriales de procesado, por ejemplo la liofilización.
- Ser registrado como aditivo alimentario.

Estas características se establecieron para probióticos utilizados en salmónidos, por lo que la importancia relativa de cada una de ellas podría diferir dependiendo de la especie piscícola con la que se trabaje.

A pesar de la acción multifactorial de algunos probióticos (Tuohy *et al.*, 2003) es muy difícil encontrar un candidato que reúna todas estas características, y como alternativa se pueden usar mezclas combinadas de probióticos (Merrifield *et al.*, 2010a) o su aplicación como simbióticos, es decir, en la forma de mezclas de probióticos y prebióticos. Los resultados obtenidos pueden indicar que son mejores los beneficios del probiótico cuando están agrupados que cuando se administra el probiótico de manera aislada (Cerezuela *et al.*, 2012).

Según Gomez-Gil *et al* (2000) básicamente el esquema en la búsqueda de un probiótico puede resumirse en (i) recolección de información; (ii) adquisición de los probióticos; (iii) evaluación del probiótico de competir con el patógeno; (iv) verificar la patogenicidad del probiótico en el hospedador; (vi) análisis económico (coste/beneficio).

Uno de los procesos selectivos de probióticos más utilizados es el que busca, a través de ensayos *in vitro*, la capacidad estas cepas (o sus productos extracelulares) de inhibir el crecimiento de una especie patógena (Chythanya *et al.*, 2002; Sotomayor y Balcázar, 2003; Vine *et al.*, 2004). Sin embargo un estudio *in vitro* no puede predecir el efecto *in vivo* (Gram *et al.*, 2001), ya que existen probióticos que no producen sustancias inhibitoras pero presentan otras características beneficiosas.

En algunos casos, tras la selección *in vitro* se realizan experimentos *in vivo* para comprobar la patogenicidad de la cepa potencialmente probiótica en el hospedador (Makridis *et al.*, 2000; Chythanya *et al.*, 2002; Hjelm *et al.*, 2004) o la protección que confiere frente a una infección experimental con patógenos (*challenge*) (Gram *et al.*, 2001; Irianto y Austin, 2002a,b; Lategan y Gibson, 2003).

Otra estrategia es utilizar probióticos en acuicultura que ya han mostrado efectividad en humanos o en la agricultura (Lara-Flores *et al.*, 2003; Nikoskelainen *et al.*, 2003; Patra y Mohamed, 2003; Planas *et al.*, 2004; Venkat *et al.*, 2004; Aubin *et al.*, 2005).

6.3. Rutas de administración

Los probióticos pueden administrarse al hospedador o al medio acuático de varias formas: (i) a través de alimento vivo (Gomez-Gil *et al.*, 1998); (ii) baño (Austin *et al.*, 1995; Gram *et al.*, 1999); (iii) añadido al cultivo (Moriarty, 1998; Spanggaard *et*

al., 2001); (iv) a través de la dieta (Rengpipat *et al.*, 2000) siendo la más difundida la administración del probiótico junto el pienso (Bucio Galindo *et al.*, 2009) (**Tabla 13**).

6.4. Mecanismos de acción de los probióticos

Los probióticos pueden actuar contra los patógenos mediante distintos mecanismos, directos o indirectos, que tiene como consecuencia la eliminación del patógeno, su control a niveles no peligrosos o la potenciación del sistema inmunitario de los peces.

6.4.1. Exclusión competitiva

La exclusión competitiva es un fenómeno en el que, al establecerse una microbiota en las mucosas, se previene o se reduce la colonización de los patógenos. Esto sucede cuando los probióticos compiten con los patógenos por los sitios de unión a la mucosa, compiten por los nutrientes o por producen sustancias que inhiben la replicación y destruyen al patógeno (Gomez-Gil *et al.*, 2000; Verschuere *et al.*, 2000; Young-Hyo *et al.*, 2001; Balcázar, 2003; Balcázar *et al.*, 2004; Vine *et al.*, 2004 Collado *et al.*, 2007). Aunque se sugiere que la competición por los sitios de adhesión es el principal modo de acción de los probióticos, existen pocas evidencias que lo apoyen al trasladar los ensayos *in vitro* a modelos *in vivo* (Vine *et al.*, 2006).

Algunos estudios han atribuido al probiótico la competición por las fuentes de energía (Rico-Mora *et al.*, 1998; Verschuere *et al.*, 2000). La competición por el hierro ha sido analizada como un factor importante, porque el hierro es necesario para la mayoría de bacterias para poder crecer, aunque generalmente el hierro se encuentra limitado en los tejidos y fluidos del pez (Gram *et al.*, 1999; Verschuere *et al.*, 2000).

La presencia de bacterias que producen compuestos antibacterianos en el intestino del hospedador, en la superficie del pez, o en el agua, puede prevenir la proliferación de patógenos e incluso su eliminación. (Verschuere *et al.*, 2000; Vine *et al.*, 2004, 2006; Merrifield *et al.*, 2010a). Antagonistas microbianos frecuentes son proteasas, (Lauková *et al.*, 2003), bacteriocinas y ácidos orgánicos (Chythanya *et al.*, 2002; Sugita *et al.*, 2002; Gullian *et al.*, 2004; Klose *et al.*, 2010).

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por todos los filos bacterianos y algunos grupos de arqueas (Klaenhammer, 1993; Shand y Leyva, 2008), estando caracterizadas unas doscientas bacteriocinas en las bases de datos BACTIBASE

y BAGEL (De Jong *et al.*, 2006; Hammami *et al.*, 2007). Las dos principales características que diferencian la mayoría de bacteriocinas de los antibióticos es que son péptidos y tienen un espectro de acción mucho más restringido (Riley y Wertz, 2002). Las bacteriocinas son muy diversas en tamaño, moléculas diana, modo de acción, modo liberación y mecanismo de inmunidad, dividiéndose en dos grupos según las sinteticen bacterias Gram negativas o Gram positivas, si bien esta clasificación está en un proceso de debate continuo (Heng *et al.*, 2006).

Las bacteriocinas sintetizadas por probióticos tienen un papel importante contra bacterias patógenas (**Figura 2**), incluso frente bacterias resistentes a antibióticos, inhibiendo la invasión de estas bacterias o limitando el avance a células (Tagg y Dierksen, 2003). También pueden mejorar la colonización de cepas bacterianas beneficiosas para el hospedador (Lenski y Riley, 2002) o actuar como inmunomoduladoras (Dobson *et al.*, 2012).

La producción de bacteriocinas por bacterias del medio marino es amplia, como se resume en la **Tabla 14**, de los géneros *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Carnobacterium* y *Aeromonas*.

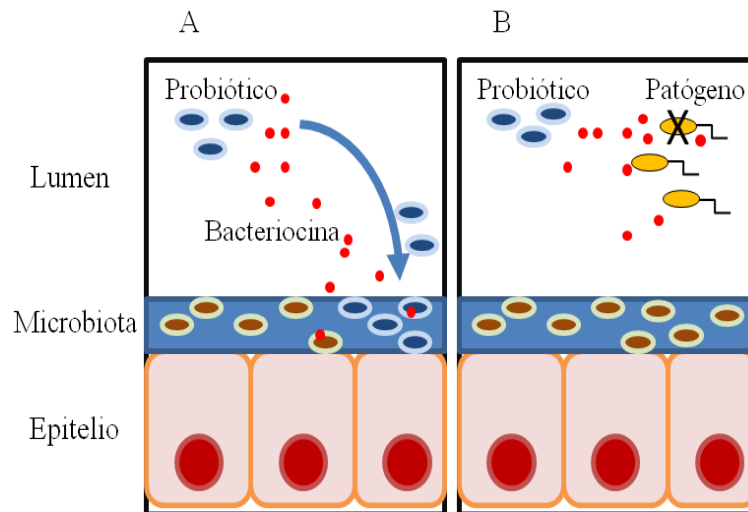


Figura 2. Mecanismos por el cual las bacteriocinas pueden contribuir a la funcionalidad del probiótico. Pueden facilitar la colonización del probiótico por inhibición de la microbiota residente (A); o pueden inhibir directamente el crecimiento de patógenos (B). (Figura adaptada de Dobson *et al.*, 2012).

Tabla 14. Principales bacteriocinas producidas por bacterias aisladas del medio marino o de la microbiota del pez. Tabla tomada de Sahoo *et al.*, 2014 y Desriac *et al.*, 2010.

Cepa productora	Bacteriocina	Cepas inhibidas	Referencia
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Sustancia inhibitoria de tipo bacteriocina	<i>Staphylococcus aureus</i>	Messi <i>et al.</i> , 2003 Moro <i>et al.</i> , 1997
<i>Carnobacterium</i> sp.	Carnocin U149	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Carnobacterium</i>	Stoffels <i>et al.</i> , 1992
<i>Carnobacterium piscicola</i> A9b	Carnobacteriocin B2	<i>Listeria</i>	Nilsson <i>et al.</i> , 2004
<i>Carnobacterium piscicola</i> CS526	Pscicocin CS526	<i>Listeria</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Tetragenococcus</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 2005
<i>Carnobacterium diversen</i> M35	Divergicin M35	<i>Carnobacterium</i> , <i>Listeria</i>	Tahiri <i>et al.</i> , 2004
<i>Carnobacterium piscicola</i> V1	Pscicocin V1a	<i>Listeria</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Carnobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i>	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>Carnobacterium piscicola</i> V1	Pscicocin V1b	<i>Listeria</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Carnobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i>	Bhugaloo-Vial <i>et al.</i> , 1996
<i>Carnobacterium diversen</i> V41	Divercin 41	<i>Listeria</i>	Duffes <i>et al.</i> , 1999
<i>Listonella anguillarum</i> AVP10	Vibriocina AVP10	<i>Escherichia coli</i> <i>Listonella anguillarum</i> AVS9	Zai <i>et al.</i> , 2009
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. X153	Proteína antibiótica P153	<i>Vibrio</i> ictiopatógeno <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Propionibacterium granulosum</i>	Longeon <i>et al.</i> , 2004
<i>Vibrio</i> sp NM10	Sustancia inhibitoria de tipo bacteriocina	<i>Pasteurella piscicida</i> K-III <i>E. coli</i> <i>V. vulnificus</i> <i>Enterococcus seriolicida</i>	Sugita <i>et al.</i> , 1997

Tabla 14 (cont.)			
Cepa productora	Bacteriocina	Cepas inhibidas	Referencia
<i>Vibrio mediterranei</i>	Molécula BLIS	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Vibrio mediterranei</i> 5	Carraturo <i>et al.</i> , 2006
<i>Vibrio harveyi</i> VIB571	Sustancia inhibitoria de tipo bacteriocina	<i>Vibrio harveyi</i> <i>Vibrio fisheri</i> <i>Vibrio gazogenes</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Prasad <i>et al.</i> , 2005
<i>Vibrio harveyi</i> SY	Harveyicina SY	<i>Vibrio harveyi</i>	Hoyt y y Sizemore, 1982 McCall y Sizemore, 1979
<i>Vibrio vulnificus</i>	IW1	<i>Vibrio vulnificus</i> <i>Vibrio cholera</i>	Shehane y Sizemore, 2002
<i>Vibrio vulnificus</i>	BC1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Shehane y Sizemore, 2002
<i>Vibrio vulnificus</i>	BC2	<i>Vibrio sp</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>E. coli</i>	Shehane y Sizemore, 2002

Respecto a su acción antiviral, aunque el mecanismo exacto no se conoce, ensayos de laboratorio indican que la inactivación de virus puede ocurrir por sustancias químicas o por los productos extracelulares de bacterias (Direkbusarakom *et al.*, 1998; Ringø *et al.*, 2010; Kim, J. W. *et al.*, 2011; Lara-Flores, 2011).

6.4.2. Mejora de la digestión

Se ha demostrado en peces el efecto beneficioso de los probióticos en los procesos digestivos mejorando la utilización del alimento y por tanto mejorando el crecimiento (Bairagi *et al.*, 2002; Bomba *et al.*, 2002; Gatesoupe, 2002; Lara-Flores *et al.*, 2003; Ramirez y Dixon, 2003; El-Haroun *et al.*, 2006; Abdelhamid *et al.*, 2009; Merrifield *et al.*, 2010a). Hay estudios que demuestran que ciertos probióticos mejoran la morfología gástrica (Merrifield *et al.*, 2010b), la destoxicación de compuestos que podrían ser perjudiciales, la desnaturalización de compuestos indigestos por la acción de enzimas hidrolíticas (como amilasas, proteasas y lipasas) (Abdel-Rhman *et al.*, 2009), la rotura de carbohidratos para producir ácidos grasos de cadena corta (Tukmechi *et al.*, 2007) y la mejora del apetito. Todo ello mejora la utilización del alimento

dismunuyendo la cantidad de alimento necesaria para el crecimiento del pez (Ten Doeschate y Coyne, 2008).

6.4.3. Estimulación del sistema inmunitario

El sistema inmune puede ser estimulado si el probiótico es añadido a la dieta o al agua de cultivo, y sus productos pueden estimular las mucosas del sistema gastrointestinal (Akhter *et al.*, 2015). Se ha investigado la función de los probióticos como inmunomoduladores en peces (Lara-Flores y Aguirre-Guzman, 2009; Pai *et al.*, 2010; Ringø *et al.*, 2010; Huang, J. B. *et al.*, 2014; Newaj-Fyzul *et al.*, 2014) (**Tabla 15**). Los probióticos estimulan el sistema inmunitario al unirse con los receptores de las células presentadoras de antígenos (macrófagos, neutrófilos), y con otros receptores celulares y humorales (Irianto y Austin, 2002a; Vendrell *et al.*, 2008). El probiótico también emite moléculas que activan las células y moléculas del sistema inmune como fagocitos (monocitos y macrófagos), neutrófilos y natural killer (Rendón y Balcazar, 2003).

La microbiota y los probióticos tiene efecto sobre el sistema inmunitario de las mucosas (Rombout, 2011), además de tener una función fisiológica en la integridad del epitelio intestinal (Merrifield, 2010c; Gisbert *et al.*, 2013; Standen *et al.*, 2013) y modular las actividades fisiológicas en las células intestinales (Ringø *et al.*, 2007; Newaj-Fyzul *et al.*, 2007; Lazado *et al.*, 2011). En el tejido intestinal, la microbiota comensal y los probióticos estimulan el sistema inmune a través del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (Lazado y Caipang *et al.*, 2014). Se ha demostrado que la población de linfocitos epiteliales y granulocitos acidófilos se incrementan de manera significativa cuando se complementa la alimentación con probióticos (Pirarat *et al.*, 2011).

La piel está directamente en pleno contacto con el medio ambiente y es una de las primeras líneas de defensa. Se ha comprobado que existe una relación entre una dieta enriquecida en probióticos y la protección que ejerce la piel ante la invasión de ciertos patógenos (Pieters *et al.*, 2008) o sobre elementos estresantes en el medio ambiente (Cordero *et al.*, 2016). Pero todavía los estudios sobre el efecto de los probióticos en la piel de pez son escasos porque la mayoría se administran a través de la dieta y, por tanto, dichos estudios se centran en la inmunidad localizada en el tejido intestinal. Es necesario analizar la influencia que tiene el probiótico sobre otras mucosas, como la piel, y conocer su interconexión con la alimentación (Esteban, 2012)

aprovechando el hecho que la piel de los peces tiene bastantes similitudes en cuando a nivel de desarrollo y funciones protectoras a la de los mamíferos (Rakers *et al.*, 2010). Por lo tanto, las observaciones realizadas en mamíferos podrían ser utilizadas como una base en la investigación de los mecanismos implicados en la respuesta inmunitaria de las mucosas en la piel del pez.

Tabla 15. Funciones de inmunoestimulación descritas con la administración de probióticos. ER, estallido respiratorio; IG, inmunoglobulina; actividad bacteriocida del suero ABS; N, adherencia neutrofilo; C, complemento; AF, actividad fagocítica; AP, antiperoxidasa; MPO, mieloperoxidasa; L, lisozima; SOD, superóxido dismutasa; M, monocitos.

Probiótico	Forma de administración	Efecto inmunológico	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Dieta	ER, ABS , N, L	Aly <i>et al.</i> , 2008
<i>Lactobacillus sakei</i>	Dieta	ER, IG, C, AF, L	Balcázar <i>et al.</i> , 2007a
<i>Lactococcus lactis</i>	Dieta	ER, IG, AF, L, C	Balcázar <i>et al.</i> , 2007a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Dieta	ER, IG, AF, L, C	Balcázar <i>et al.</i> , 2007a, 2009
<i>Aeromonas sorbia</i>	Dieta	ER, AF, L, M,	Brunt y Austin, 2005; Brunt <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus spp</i>	Dieta	L, MPO, Antiproteasa	Cha <i>et al.</i> , 2013
Pdp11,51M6	Dieta	AF, ER	Choi <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	Dieta	L, AP.	Das <i>et al.</i> , 2013;
<i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>S. baltica</i>	Dieta	AF , C, AP, ER	Díaz-Rosales <i>et al.</i> , 2006, 2009
<i>Vibrio fluvialis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Aeromonas hydrophilla</i>	Dieta	L	Diaz-Rosales <i>et al.</i> , 2009
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> Y <i>Arthrobacter spp</i>	Dieta	L	Geng <i>et al.</i> ,2012
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Dieta	L, ER, AP	Giri <i>et al.</i> , 2013
<i>Lactococcus lactis</i>	Dieta	C, ER, MPO	Heo <i>et al.</i> , 2013
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Dieta	M	Huang, J. B. <i>et al.</i> , 2014;
Coco Gram-positivo	Dieta	L, ER	Irianto y Austin, 2002b
<i>Vibrio fluvialis</i>	Dieta	L, ER	Irianto y Austin, 2002b
<i>A. hydrophilla</i>	Dieta	L, ER	Irianto y Austin, 2003

Tabla 15 (cont.)			
Probiótico	Forma de administración	Efecto inmunológico	Referencia
<i>Zooshikella</i> spp.	Dieta	IG	Kim, J. S. <i>et al.</i> , 2010
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	Dieta	ER, L, ER	Kim y Austin 2006
<i>Carnobacterium divergens</i>	Dieta	ER, L, ER	Kim y Austin, 2006
<i>Pseudomonas</i> sp.	Dieta	ER, M	Korkea-Aho <i>et al.</i> , 2011
<i>Bacillus subtilis</i>	Dieta	ER, ABS, IG, AP, C, L, MPO, M	Newaj-Fyzul <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>L. plantarum</i>	Dieta	L, ER	Lee, J. S. <i>et al.</i> , 2013
<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus pumilus</i>	Agua/Alimento Vivo	L, IG	Mandiki <i>et al.</i> , 2011
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Dieta	M	Merrifield <i>et al.</i> , 2010b
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Dieta	IG, ER, C, AF, L	Nikoskelainen <i>et al.</i> , 2003
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Dieta	AF, ER, CA, MPO	Ortuño <i>et al.</i> , 2002
<i>Clostridium butyricum</i>	Dieta	L, AF, CA, IG, ER	Pan <i>et al.</i> , 2008
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Agua	Expresión y regulación de citoquinas	Panigrahi <i>et al.</i> , 2007
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Individual Alimento vivo	IG	Picchietti <i>et al.</i> , 2009
<i>Aeromonas sorbia</i> ,	Dieta	ER, C, AF, L, IG	Pieters <i>et al.</i> , 2008
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Dieta	AF, C, ER, L, IG	Pirarat <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Lactobacillus</i> sp.,	Dieta	L, Antiproteasa, MPO	Ridha y Azad 2012
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Dieta	AF, actividad citotóxica	Salinas <i>et al.</i> , 2005
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , PdP11, 51M6	Dieta	ER, actividad citotóxica	Salinas <i>et al.</i> , 2006

Tabla 15 (cont.)			
Probiótico	Forma de administración	Efecto inmunológico	Referencia
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Dieta	ER, AP, AF, C, IG	Salinas <i>et al.</i> , 2008
<i>Kocuria</i> spp.	Dieta	AF, AP, ER, L	Sharifuzzaman y Austin, 2010
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Dieta	L, AF, AP, CA	Son <i>et al.</i> , 2009
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Clostridium butyrium</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Dieta	N, L, ER,	Song <i>et al.</i> , 2006
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Dieta	Expresión y regulación de citoquinas, N	Standen <i>et al.</i> , 2013
<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus clausii</i>	Dieta	L, ER, Antiproteasa, MPO	Sun, Y. Z. <i>et al.</i> , 2010
<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Dieta / Agua	AF, Óxido nítrico	Taoka <i>et al.</i> , 2006
<i>Enterococcus faecium</i>	Agua	C, ER, MPO, L	Wang, Y. B. <i>et al.</i> , 2008
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Dieta	ER	Xing <i>et al.</i> , 2013
<i>Bacillus coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Agua	ER, SOD, MPO	Zhou <i>et al.</i> , 2009

Una de las líneas de investigación que se sigue con los probióticos es su uso como adyuvante para mejorar la eficiencia de las vacunas. Hasta el momento los mayores avances se han dado en el campo de la investigación humana (Thomas y Ockhuizen, 2012) siendo escasas las aplicaciones de probióticos como adyuvantes en el campo de la acuicultura. Únicamente se han utilizado para potenciar la acción de la vacuna fracciones del microorganismo como betaglucanos (Ogier de Baulny *et al.*, 1996; Kamilya *et al.*, 2006; Selvaraj *et al.*, 2006) y lipopolisacáridos (Selvaraj *et al.*, 2006) que han conseguido estimular la respuesta celular e inflamatoria en el pez.

Otra de las potenciales capacidades de los probióticos es la capacidad de producir anticuerpos (Kaila *et al.*, 1992; Maassen *et al.*, 2003). Algunos autores establecen que una de las características que debe poseer un probiótico es la de no

activar la respuesta inmunitaria específica (Korkea-aho *et al.*, 2012). Se supone que si un microorganismo es capaz de activar la producción de anticuerpos es porque de algún modo entra en contacto con las células inmunitarias, y esto puede implicar que la bacteria tiene capacidad de invadir los tejidos. Esto podría ser peligroso en algunos casos: en humanos se han descrito casos de septicemia y problemas autoinmunes ocasionados por la ingestión de probióticos (Doron y Snyderman, 2015). Sin embargo hay descritos casos en los que algunos probióticos han activado la producción de anticuerpos específicos, sin que por ello se haya observado un efecto perjudicial sobre el animal (Brunt y Austin, 2005; Brunt *et al.*, 2007; Arijó *et al.*, 2008; Abbass *et al.*, 2010). En algunos casos la producción de anticuerpos se ha asociado con un efecto beneficioso. Por ejemplo, al administrar *Aeromonas sobria* y *Bacillus subtilis* de manera intraperitoneal o intramuscular individuos de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), estas se protegieron frente la yersiniosis producida por *Yersinia ruckeri* (Abbas *et al.*, 2010). Arijó *et al.*, (2008) observaron que la administración de la cepa probiótica *Aeromonas sobria* A3-51 en trucha (*Oncorhynchus mykiss*) estimuló la producción de anticuerpos específicos frente al probiótico. Dichos anticuerpos mostraron reacción cruzada frente a *V. harveyi*. Igualmente se observó una protección frente a infecciones experimentales con *V. harveyi*, de los peces alimentados con el probiótico, muy similar a la obtenida en los peces inmunizados con bacterina del patógeno. Estas cepas (*Aeromonas sobria* y *Bacillus subtilis*), administradas por vía oral, ya mostraron con anterioridad su capacidad de proteger a la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) frente *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii* (Brunt *et al.*, 2007) *Streptococcus iniae* y *Lactococcus garvieae* (Brunt y Austin, 2005). Sobre esta aplicación de probióticos como estimuladores de la producción de anticuerpos que den reacción cruzada con un patógeno no existen demasiadas referencias, de ahí su novedad e importancia.

6.5. Seguridad y evaluación de probióticos

La identificación de nuevos probióticos en acuicultura no está libre de riesgos ni para el hospedador ni para la salud humana, por lo tanto es fundamental la evaluación de la seguridad del probiótico en el proceso de selección (Wang, Y. B. *et al.*, 2008). Incluso con la aplicación de cepas diferentes a las usadas de manera convencional,

como las que se incluyen en el género *Lactobacillus*, se deben buscar criterios de seguridad diferentes a los que se aplicaba de manera tradicional (Adams, 1999).

Por ese motivo la Comisión Europea (R (UE) n° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003) armoniza la legislación relativa a los probióticos dentro de las fronteras de la Unión Europea, requiriendo que las nuevas cepas probióticas deben ser caracterizadas tanto por su eficacia como por su seguridad en el pez, el consumidor final y en el medio ambiente. Las pruebas de seguridad deben incluir la determinación de la resistencia a una amplia gama de antibióticos para confirmar que no existe la transmisión de genes de resistencia de antibióticos o plásmidos de virulencia a la microbiota comensal (Moubareck *et al.*, 2005; Courvalin, 2006). También se pueden aplicar técnicas moleculares, como la PCR, para asegurar que la cepa está bien caracterizada (Huys *et al.*, 2006) e incluso es posible evaluar la seguridad de los probióticos mediante cultivo celular (Wang y Xu *et al.*, 2007; Cencič y Langerholc, 2010). Otros aspectos necesarios que deben ser evaluados en la seguridad son si un exceso accidental del probiótico suministrado al pez supone un problema en su salud (Ige, 2013), si el probiótico se acumula en el pez siendo un problema para el consumidor final si el alimento no se cocina completamente (Martínez Cruz *et al.*, 2012) o si el probiótico tiene un impacto en el medio ambiente (Anadón *et al.*, 2006).

7. Hipótesis de partida

En los procesos de respuesta inmune, las reacciones cruzadas entre bacterias filogenéticamente emparentadas, pero de distinta especie, es algo que está ampliamente documentada, teniendo un papel importante en la protección frente a patógenos (Beal, 2006). De hecho algunos diseños de vacunas se basan en la utilización de microorganismos no patógenos que contienen antígenos similares a las cepas patógenas (Brunt y Austin, 2005; Brunt *et al.*, 2007; Arijo *et al.*, 2008; Abbass *et al.*, 2010).

En este contexto podrían existir bacterias probióticas con antígenos comunes a los patógenos, lo que permitiría su uso como vacunas vivas, ejerciendo sobre el pez al menos un doble efecto protector: la formación de bacteriocinas inhibidores de patógenos, y la activación de la respuesta inmunitaria específica, con la formación de anticuerpos capaces de proteger frente a un patógeno. Esto abre un nuevo campo a la investigación tanto en peces como en otros animales. De hecho, Arijo *et al.* (2008) ya descubrieron una bacteria que tenía tanto la característica de inhibir a *V. harveyi*, como la existencia de antígenos comunes al patógeno. Esta cepa administrada en la alimentación protegió a los peces (truchas arcoiris) frente a infecciones experimentales con el patógeno administrado por inyección intraperitoneal.

Debido a los antecedentes previos, la tesis se basa en las siguientes hipótesis:

1. Existen bacterias que presentan antígenos comunes a *V. harveyi* y *P. damsela* subsp. *piscicida* y que a su vez podrían ser consideradas como probióticas, entre otras características por su capacidad de inhibir el crecimiento de estos patógenos.
2. La administración de estos probióticos a *S. senegalensis* generaría la activación del sistema inmunitario, tanto inespecífico como específico, generándose anticuerpos.
3. Los anticuerpos producidos contra estos probióticos darían una reacción cruzada con los antígenos de los patógenos, generando protección en *S. senegalensis* frente *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*.
4. La bacteria probiótica poseería un efecto combinado positivo con una vacuna frente a los patógenos estudiados, de tal manera que los probióticos actuarían como potenciadores de la respuesta secundaria de las vacunas.

OBJETIVOS

Se estableció como objetivo general en el siguiente trabajo **la selección probióticos estimulantes de la respuesta específica como método preventivo en enfermedades causadas por *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi* para su potencial uso en el cultivo de *Solea senegalensis*.**

Este objetivo se abordó mediante los siguientes objetivos parciales:

1. Detección de antígenos de *P. damsela* y *V. harveyi* involucrados en la producción de anticuerpos en lenguados.
2. Selección de microorganismos con antígenos comunes a *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi* y estudio de su potencial probiótico.
3. Evaluación de la respuesta inmunitaria inducida por el potencial probiótico seleccionado.
4. Evaluación del uso combinado del probiótico seleccionado y de una vacuna para aumentar el grado de protección de los lenguados frente a los patógenos.

MATERIAL y MÉTODOS

1. Obtención de anticuerpos de *Solea senegalensis* frente a *P. damselae* subsp. *piscicida* y *V. harveyi* e identificación de las proteínas más inmunogénicas

Estos procedimientos se realizaron con el objetivo de obtener suero de lenguados con anticuerpos policlonales frente a los antígenos presentes en los patógenos estudiados.

1.1. Animales empleados

En el estudio se emplearon lenguados (*Solea senegalensis*, Kaup) de 400 g procedentes de la Planta de Cultivos Marinos de la Universidad de Cádiz. Los animales se mantuvieron en 4 tanques de fibra de vidrio (**Figura 3**), con 1 m³ de agua de mar, con aireación constante y circuito abierto. Todos los experimentos con animales cumplieron la normativa europea (2010/63/EU) y española (RD 53/2013) en bienestar animal.



Figura 3. Tanques donde se realizó el mantenimiento de los peces inmunizados frente *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V.harveyi* Lg16.00

1.2. Cepas bacterianas

Se utilizaron cepas virulentas para *Solea senegalensis* aisladas de ejemplares enfermos de esta especie. Las cepas usadas fueron *Vibrio harveyi* Lg16.00 (DL50 = $7,4 \times 10^4$ ufc/g, Zorrilla *et al.*, 2003) y *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* Lg41.01 (DL50 = $2,2 \times 10^4$ ufc/g, Díaz-Rosales *et al.*, 2003). Las cepas se conservaron hasta su uso en medio de criopreservación *Maintenance Freeze Medium* (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) a -80 °C.

1.3. Obtención de bacterina

Se utilizó el protocolo de Arijo *et al.* (2005b) para la obtención de la bacterina. Los microorganismos se cultivaron en aerobiosis en caldo de soja tripticasa al 2 % de NaCl (TSBs) y agar de soja tripticasa al 2 % de NaCl (TSAs) a una temperatura de 22 °C durante 24 h para *V. harveyi* Lg16.00 y 48 h en el caso de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y en aerobiosis. Tras la incubación, las células se recogieron mediante centrifugación a $6.000 \times g$ en centrífuga *Centrifuge 5810R* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), y se resuspendieron en tampón fosfato salino estéril (PBS, pH 7,2) hasta obtener una suspensión de 10^9 cels/mL. Se añadió formol (VWR, Fontenay-sous-Bois, Bélgica) en cada uno de los tubos hasta obtener una concentración final de 1 % para inactivar las células. La suspensión se incubó durante 18 h a 4 °C, recogiendo las células por centrifugación a $6.000 \times g$ durante 20 min a 4 °C. Se realizaron tres lavados posteriores con PBS a $6.000 \times g$, 20 min, y después se resuspendieron en PBS a una concentración final de 10^9 cels/mL. La comprobación de la inactivación de las bacterias se realizó mediante siembra de las bacterinas en placas de TSAs, y su incubación a 22 °C durante 48-72 h. Se consideró que la bacterina había sido completamente inactivada si no se observó crecimiento de las mismas en la placa.

1.4. Extracción de Productos Extracelulares (ECP)

La obtención de esta fracción antigénica se realizó por la técnica de Liu (1957). Para el aislamiento de los productos extracelulares (ECP), se sembró la cepa en medio TSAs a 22 °C durante 24-48 h, tras lo cual se eligió una colonia de dicho cultivo para inocular un tubo con 3 mL de TSBs. Posteriormente se tomaron 0,2 mL del cultivo y se extendieron sobre una placa de TSAs cubierta por una lámina de celofán estéril,

incubándose a 22 °C durante 24 h para *V. harveyi* Lg16.00 o 48 h para *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01. Las células bacterianas se recogieron de la lámina de celofán mediante un portaobjetos estéril con 2 mL de PBS estéril. Esta suspensión se centrifugó a 13.500 ×g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de una membrana con diámetro de poro de 0,20 µm, siendo utilizado como preparación de ECP.

La concentración proteica de la muestra de ECP se determinó con el método de Bradford (Bradford, 1976). Se mezclaron 5 µL de las diferentes muestras con 250 µL de solución Bradford (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) y se dejó reaccionar la mezcla durante 15 min. Después se midió en un lector de placas *Multiskan Ascent* (Thermo Fisher, Vantaa, Finlandia) a una absorbancia de 595 nm. La recta patrón se realizó con albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) en un rango de 0,1 a 1,5 mg/mL. Una vez realizada la cuantificación, se ajustó la muestra proteica con PBS hasta una concentración proteica de 200 µg/mL. Posteriormente, las proteínas de la muestra se precipitaron adicionando tres volúmenes de acetona (Sigma, Francia) enfriada a -20 °C, e incubando la muestra a -20 °C durante 2 h. Finalmente, la muestra se centrifugó a 15.000 ×g durante 10 min a 4 °C, descartándose el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado en PBS. La inactivación de la muestra de ECP se realizó añadiendo formol a una concentración final del 1 %. Tras 24 h de incubación a 4 °C, la muestra se calentó a 100 °C durante 30 min. La solución de ECP inactivada se mezcló con la solución de bacterina en una proporción de 1/10. La esterilidad de los ECP se confirmó inoculando 0,1 mL en placas de TSAs y comprobando la ausencia de crecimiento bacteriano tras 48 h de incubación a 22 °C.

1.5. Inmunización de los peces

La inmunización de los lenguados se realizó con una mezcla de bacterina y ECP. Para la inmunización se utilizaron 30 lenguados (*Solea senegalensis*) de 400 g en grupos de 10 peces por tratamiento, que se anestesiaron mediante adición al agua de aceite de clavo (Farma-Química Sur, Málaga, España) a 100 ppm. Las vacunas se administraron por vía intraperitoneal con agujas con un diámetro de 0,5 mm (BD microlance, Drogheda, Irlanda). En el caso de la vacuna frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01, la primera inoculación se realizó con 0,2 mL de la suspensión de bacterina y ECP, y 45 días después se realizó una segunda inoculación utilizando 0,2 mL de la suspensión bacterina-ECP en emulsión 1:1 con adyuvante incompleto de

Freund (FIA) (Sigma, Stenheim, Alemania) (**Figura 4**). En el caso de la vacunación con *V. harveyi* los peces se inocularon con 0,2 mL de la suspensión de bacterina y ECP en emulsión 1:1 con FIA y 45 días después se realizó nuevamente una segunda inoculación con la suspensión bacterina-ECP en FIA. Además se dejó un grupo de 10 peces sin inocular y en las mismas condiciones de mantenimiento en las que permanecerían los peces vacunados para ser utilizados como controles negativos del experimento.

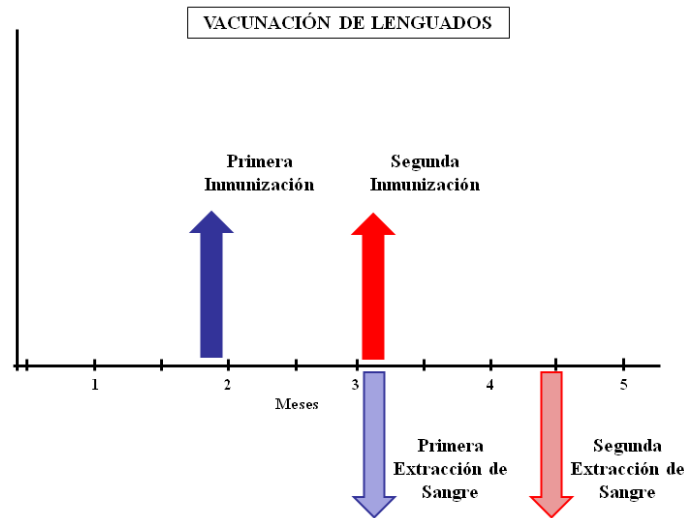


Figura 4. Cronograma de vacunación de lenguados *Solea senegalensis* inmunizados frente *P. damselae subsp. piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00.

Al mes de esta primera inmunización, se sacrificaron 10 peces mediante inmersión con aceite de clavo (200 ppm), y posterior extracción de sangre de la vena caudal con una jeringuilla de insulina estéril y no heparinizada. La sangre obtenida se introdujo con cuidado, para evitar la lisis de los eritrocitos, en viales con gel para sueros de 4,4 mL (Sarstedt, Numbrech, Alemania) y se dejó coagular a temperatura ambiente durante 3-5 h. Se centrifugó a 6000 \times g durante 20 min a 4 °C, y se extrajo el suero con cuidado, repartiéndose en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) en volúmenes de 1 mL por vial, y manteniéndose a -80 °C hasta su uso. El resto de los peces se inoculó con la misma vacuna, tal como se ha explicado anteriormente. Un mes después de la segunda inmunización los peces se sacrificaron mediante inmersión en aceite de clavo a 200 ppm y se desangraron para obtener suero. Finalmente los sueros se conservaron a -80 °C antes de ser utilizados para los análisis de ELISA.

1.6. Titulación de anticuerpos específicos en el suero (ELISA)

La titulación de anticuerpos se obtuvo a través de la técnica ELISA (Robertson *et al.*, 1998). Con esta técnica se midió el título de anticuerpos específicos que presentaban los peces inmunizados frente a la bacterina y ECP de *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01 y frente a bacterina y ECP de *V. harveyi* Lg16.00.

Se pusieron 50 μ L de las preparaciones antigenicas a estudiar en placas de 96 pocillos de fondo plano *Nunc-Immuno* de tipo *MaxiSorp* (Thermo, Roskilde, Dinamarca). En el caso de la bacterina se pusieron 50 μ L de una suspension con absorbancia a 10^8 ufc/mL, y en el caso de los ECP 50 μ L a una concentracion de 20 μ g de proteínas/mL. La placa se incubó con los antígenos durante 18 h a 4 °C para permitir la fijación de los antígenos a la placa.

Los pocillos se lavaron tres veces con PBS con Tween 20 (Sigma, Steinheim, Alemania) al 0,25 % (PBS-T). Tras los lavados se añadieron a cada pocillo 300 μ L de PBS-T con leche desnatada en polvo al 3 % (p/v) con el fin de cubrir los sitios de unión inespecíficos de los pocillos. La placa se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Después se lavó tres veces con PBS-T y se inocularon 50 μ L de distintas diluciones del suero de los peces, tanto de peces inmunizados como controles. En los pocillos que se emplearían como blanco se añadieron 50 μ L de PBS. La placa se incubó durante 2 h a temperatura ambiente.

Tras la incubación, la placa de ELISA se aclaró tres veces con PBS-T y se añadieron 50 μ L del primer anticuerpo policlonal de conejo anti-Ig de lenguado (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos) (a partir de Ig de lenguado purificada por el Dpto. de Microbiología de la Universidad de Málaga), en una disolución 1:1000 PBS-T-BSA. Se incubó la placa durante 2 h a temperatura ambiente para posteriormente lavar tres veces con PBS-T. Seguidamente se añadieron 50 μ L del segundo anticuerpo (Inmunoglobulina de cabra anti-Ig de conejo y conjugada con peroxidasa (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos) utilizado a una dilución 1:5000 en PBS-T-BSA.

Después de incubar la placa durante 1 h a temperatura ambiente, se lavó tres veces con PBS-T. La cuantificación de anticuerpos se basó en una respuesta colorimétrica al añadirse 200 μ L de la solución de revelado o-fenilendiamina dihidroclorídrico (OPD) (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) e incubarse durante 30 min. La reacción colorimétrica se detuvo al añadir a los pocillos 50 μ L de una solución

3 M de H₂SO₄ (Merck, Darmstadt, Alemania). Por último se leyeron los resultados en un lector de placas *Multiskan Ascent* a una absorbancia de 490 nm. El título de anticuerpos se expresó en base a las diluciones límites de las muestras, entendiéndose por dilución límite la máxima dilución de la muestra con un valor mayor o igual a la media de los controles más el doble de su desviación típica (Bergmeyer *et al.* 1983).

$$DL = X \geq C + 2SD$$

DL: dilución límite

X: Absorbancia de la muestra

C: media de la absorbancia en las diluciones control

SD: desviación típica de la absorbancia en las diluciones control

1.7. Determinación de las proteínas inmunorreactivas de *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi* para *Solea senegalensis*

Se propuso determinar cuáles eran los antígenos proteicos de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00 con mayor capacidad de generar una respuesta inmunitaria específica en los lenguados, empleando para ello la metodología de *Western blot*. Las proteínas analizadas se aislaron a partir de los ECP, obtenidos como previamente se ha especificado en el **apartado 1.4.** y de membrana externa de las bacterias (OMP).

1.7.1. Extracción de proteínas de membrana externa (OMP)

Para la obtención de las proteínas de membrana externa se empleó el protocolo de Lambert (1988). *V. harveyi* Lg16.00 se incubó en TSAs durante 24 h a 22 °C mientras que *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 se incubó durante 48 h. Tras la incubación se recogió la masa bacteriana de tres placas de TSAs resuspendiéndola en 10 mL de PBS. Se realizaron tres lavados a 3.500 ×g durante 15 min a 4 °C y se resuspendió el sedimento en el mismo volumen de PBS. Posteriormente se comprobó que la densidad óptica fuera superior a un valor de 2 midiendo a 600 nm de longitud de onda. Se centrifugó de nuevo a 3.500 ×g durante 30 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió la muestra en solución de PBS que contenía 10 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Serva, Heidelberg, Alemania) y 2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma, Steinheim, Alemania), y se ajustó la suspensión a una densidad óptica de 1 a 600 nm. Seguidamente se incubó durante 30 min a 45 °C en un baño termostático. La función del PMSF es la de evitar la

proteolisis, mientras que el EDTA estimula la disgregación de la estructura celular. Tras la incubación se procedió a la aplicación de 2 pulsos de ultrasonido *UP400S* (Hielscher, Teltow, Alemania), de 1 min a 50 W descansando de un minuto a otro para evitar que la muestra se caliente. Se centrifugó a 3.500 \times g durante 20 min. Finalmente se recogió el sobrenadante, el cual contenía las proteínas de membrana disueltas. La muestra con la fracción celular ya aislada se conservó a -20 °C hasta su utilización.

1.7.2. Medida de la concentración de proteínas

A cada una de las fracciones bacterianas se les midió su concentración en proteínas por el método de Bradford (1976) (ver **apartado 1.4.**).

Para la precipitación proteica se partió de un volumen de muestra que proporcionase una cantidad de proteínas análoga a la que se vaya a cargar en el gel. Posteriormente, las proteínas se precipitaron mediante al menos tres volúmenes de acetona preenfriada a -20 °C e incubando la muestra a -20 °C durante 2 h. Finalmente se centrifugó a 15.000 \times g durante 10 min a 4 °C. Se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente y se redisolvió el precipitado directamente en el tampón de muestra en el volumen final deseado.

1.7.3. Determinación de proteínas mediante Electroforesis monodimensional

Las muestras se resuspendieron en tampón de muestra (Serva, Heidelberg, Alemania) (ver **Anexo 2**), de manera que la concentración final de proteínas de las muestras fuera de 1 mg/mL. Las muestras se incubaron durante 5 min a 100 °C en termobloque *QBD2* (Grant, Cambridge Reino Unido) para desnaturalizar las proteínas. Posteriormente se centrifugaron por 10 min a 15.000 \times g.

Para la electroforesis se utilizaron geles de 8,6 \times 6,8 cm de tamaño. Los geles se prepararon según se resume en el **Anexo 2**.

- Gel de SDS-Poliacrilamida: Una vez introducido el gel entre los cristales, se dejó el gel unos 30 min hasta que polimerizara, para posteriormente preparar el gel concentrador.

- Gel concentrador: Se esperó 20 min para que solidificara el gel concentrador para retirar los peines del gel. El gel empleado para la electroforesis 2D no posee la parte de gel concentrador.

Los geles se cargaron con 15 μ L de las muestras y 5 μ L de marcador de peso molecular *Prestained SDS-Standards Low Range* (Biorad, Hercules, Estados Unidos) y

se corrieron a 15 mA por gel con fuente de alimentación *PowerPac 300* (Biorad, Hercules, Estados Unidos) hasta que el frente llegase al final de la parte separadora, y posteriormente a 30 mA por gel hasta que el frente salga del gel. Los geles se tiñieron con azul de coomasie G250 (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) (Dyballa y Metzger, 2009) (ver **Anexo 3**).

1.7.4. Determinación de proteínas mediante Electroforesis Bidimensional

La identificación de las proteínas más inmunorreactivas se llevó a cabo mediante geles y *Western blots* de dos dimensiones. La primera parte se basó en la hidratación de la tira *Immobilized pH gradient* (IPG) de 11 cm *ReadyStrip IPG* (Biorad, Hercules, Estados Unidos). La muestra se limpió de detergentes iónicos, sales, ácidos nucleicos, lípidos y otros artefactos, y se concentró mediante un kit de limpieza *ReadyPrep 2-D Cleanup Kit* (Biorad, Hercules, Estados Unidos). También se utilizó un inhibidor de proteasas (*ProteoBlock Protease Inhibitor Cocktail*, Fermentas, Waltham, Estados Unidos). La muestra con 200 µg de proteína se resuspendió en 200 µL de solución de hidratación (ver **Anexo 2**), se agitó vigorosamente durante 30 s y se dejó incubar durante 30 min. Se centrifugaron los tubos a 8.000 ×g durante 10 min, y posteriormente se inoculó el sobrenadante en cada calle de la bandeja de hidratación donde se iba a añadir la tira IPG. Se colocaron las tiras y se esperó 30 min a que las tiras absorbieran la muestra. Se aplicó aceite mineral para evitar la evaporación y la precipitación de la urea. Posteriormente se dejó la bandeja en el aparato de isoelectroenfoque *Protean IEF Cell* (Biorad, Hercules, Estados Unidos) para efectuar la hidratación a una temperatura constante de 20 °C durante 16 h.

Después de finalizar el proceso de hidratación se utilizó una bandeja de isoelectroenfoque del mismo tamaño que la tira IPG. Con la ayuda de unas pinzas, se colocó un papel de algodón en ambos extremos de los canales de la bandeja que se fuera a utilizar, y se transfirió cada una de las tiras IPG al canal correspondiente de la bandeja de isoelectroenfoque. Se cubrió con 2-3 mL de aceite mineral todas las tiras, se colocó la bandeja dentro del aparato de isoelectroenfoque y se programó en un único paso a un voltaje de 8.000 V y 35.000 Vh en un régimen exponencial a una temperatura de 20 °C. El aparato de isoelectroenfoque consigue que la corriente por tira no exceda 50 µA por tira IPG. Después de completar el isoelectroenfoque, se eliminó el aceite sobrante de cada tira de IPG y se transfirió a una nueva bandeja de hidratación. Estas tiras se pueden

congelar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se utilicen para llevar a cabo la segunda dimensión en electroforesis desnaturante en gel de acrilamida.

Seguidamente se eliminó el aceite sobrante del isoelectroenfoque, y se equilibraron las tiras IPG mediante dos tampones de equilibrado diferentes: tampón de equilibrado 1 y tampón de equilibrado 2 (ver **Anexo 2**) en un volumen de 4 mL y un tiempo de 10 min. Se empapó cada tira de IPG con solución de migración Tris-Glicina-SDS. Se preparó el gel de 10 % de poliacrilamida con un tamaño de $10 \times 15\text{ cm}$ (ver **Anexo 2** para la composición de los geles y tampones utilizados). Posteriormente se inoculó solución de agarosa (Pronadisa, Torrejón de Ardoz, España) y se introdujo con cuidado la tira de IPG en la cubeta de electroforesis vertical *Omnipage* (Cleaver Scientific, Warwickshire, Reino Unido). Se eligió un voltaje inicial de 50 V durante la primera media hora y posteriormente constante de 200 V, comprobándose el frente de migración por el azul de bromofenol. Se realizaron dos electroforesis en paralelo y con las mismas muestras. Uno de los geles se utilizó para el análisis de *Western blot* (detección de proteínas inmunorreactivas), mientras que el otro se tiñó para la observación de proteínas totales en la muestra.

1.7.5 *Western blot*

Para el análisis de *Western blot* se utilizó la técnica descrita por McIntosh y Austin (1996), transfiriendo las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro de poro (Serva, Heidelberg, Alemania) y poniéndolas en contacto con antisuero de los peces inmunizados.

Para ello, una vez obtenido el gel de electroforesis, se lavó ligeramente la membrana y gel con agua destilada. La membrana y el gel, junto a dos papeles de filtro (*Thick Blot Filter Paper*, Biorad, Hercules, Estados Unidos) se equilibraron durante 15-30 min con tampón de carrera (Bjerrum *et al.*, 1986) (Ver **Anexo 2**). Seguidamente se humedeció la superficie del aparato de transferencia semihúmedo (*Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Biorad, Hercules, Estados Unidos) con tampón de carrera y se colocó sobre la superficie uno de los papeles humedecidos. Después se depositó la membrana de nitrocelulosa sobre el papel y sobre ella se colocó el gel de electroforesis, cubriendo por último con un papel humedecido en el tampón de carrera. Cada vez que se colocaba una de las capas se pasó una pipeta de vidrio sobre la superficie para evitar que quedasen burbujas que impidiesen la transferencia. Finalmente la transferencia se realizó a un régimen constante de 300 mA durante 30 min (60 min para geles grandes).

Tras la transferencia se incubó la membrana durante 1 h con la solución de bloqueo, compuesta por PBS-T con leche desnatada en polvo al 3 % (p/v) (PBS-T-L), en agitación suave (50 rpm) a 4 °C para bloquear los sitios de unión inespecíficos. Una vez transcurrida la incubación, la membrana se lavó 3 veces durante 5 min con PBS-T, y después se incubó durante 1 h en agitación, y luego durante 18 h a 4 °C, con una mezcla de sueros de lenguados inmunizados frente a *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01 o *V. harveyi* Lg16.00 a una dilución 1:400 en PBS-T-L. Como controles se usaron sueros de lenguados sin inmunizar. Este paso fue seguido por tres lavados con PBS-T, y una incubación durante 1 h con suero de conejo inmunizado frente a inmunoglobulina de lenguado a una dilución 1:1000 en PBS-T-L. Después de un lavado con PBS-T, la membrana se incubó durante 1 h con anticuerpos de cabra conjugados con peroxidasa frente a anticuerpos de conejo (Sigma St. Louis, Estados Unidos) en una dilución 1:5000 en PBS-T-L. Después de este tiempo se lavó dos veces con PBS-T y dos veces con PBS. Las membranas se visualizaron con 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) substrato estabilizado (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) durante al menos 10 min, hasta que apareció el color azul de las bandas. Para parar la reacción se lavó la membrana en agua destilada, 3 veces, durante 5 min.

1.7.6. Tinción y análisis de la imagen

A los geles no transferidos a la membrana se les aplicó una tinción de plata para determinar las proteínas totales (Shevchenko *et al.*, 1996) (**Anexo 3**) en recipientes de vidrio y en agitación. Se lavaron los geles en agua químicamente pura y se conservaron a 4 °C el menor tiempo posible. Después de la tinción, se escaneó el gel con un densitómetro *GS-800* (Biorad, Hercules, Estados Unidos) a 700 ppi y se procesó la imagen con el programa informático *Quantity One* (Biorad, Hercules, Estados Unidos).

1.7.7. Identificación de las bandas

Se comparó el gel 2D con la membrana del *Western blot* solapando las dos imágenes, y se mandó a secuenciar mediante espectrometría de masas aquellas manchas procedentes de proteína inmunorreactivas que fueron coincidentes entre el gel teñido y la membrana del *Western blot*. Para ello, después de lavar el gel con agua químicamente pura para eliminar cualquier modificación de los grupos amino de las proteínas, se extrajeron las proteínas deseadas mediante puntas para cortar bandas (Clever Scientific). Dichas proteínas se mandaron a la Unidad de Proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba. Las proteínas fueron hidrolizadas

mediante tripsina obteniéndose pequeños péptidos cuyas masas absolutas se determinaron mediante espectrometría de masas (MALDI/TOF-TOF) obteniéndose un espectro o huella peptídica. Este espectro se comparó con bases de datos de proteínas MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) asociándose la proteína aislada con la más semejante estadísticamente.

2. Selección y caracterización de probióticos potenciales con similitud antigénica frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*

2.1. Cepas ensayadas

Se estudiaron un total de 718 cepas cultivables a 22 °C en aerobiosis y en medio TSAs y aisladas de agua de mar, de mucus epitelial y del intestino de ejemplares sanos de doradas (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), jurel (*Trachurus mediterraneus*), boquerón (*Engraulis encrasicolus*), acedía (*Dicologlossa cuneata*), lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) y otros peces planos (**Anexo 4**).

2.2. Selección de bacterias con antígenos comunes

Las bacterias se cultivaron en TSAs a 22 °C durante 24 h, tras lo cual las suspensiones bacterianas se centrifugaron a 6.000 ×g durante 20 min a 4 °C. Los precipitados se lavaron una vez en tampón salino (PBS) y finalmente se resuspendieron en PBS estéril, ajustándose en el espectrofotómetro a una densidad óptica (D.O.) a 600 nm de 1 (aproximadamente 10⁹ ufc/mL). Se realizó la lisis bacteriana de la muestra mediante un baño a 60 °C durante 60 min y después se enfrió a 4 °C antes de ser repartida y almacenada a -20 °C (Helmerhorst *et al.*, 1998).

Sobre la membrana de nitrocelulosa se dibujó con lápiz un área de 15×15 mm y en cada área se depositaron por duplicado gotas de 2 µL de cada una de las suspensiones de las cepas (Zijun, 2004 con modificaciones). Las gotas se dejaron secar sobre la membrana durante 1 h a temperatura ambiente. Como controles positivos se utilizaron las cepas con la que se habían inmunizado los peces (bien *V. harveyi* Lg16.00 o *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01). Como controles negativos se utilizó PBS o cepas frente a las cuales los peces no habían sido inmunizados. La membrana se incubó durante 1 h frente suero de lenguado inmunizado frente *P. damsela* subsp. *piscicida*

Lg41.01 o frente a *V. harveyi* Lg16.00 obtenidos según se menciona en el **apartado 1.7.1**. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS-T y una incubación durante 1 h con suero de conejo inmunizado frente a lenguado, en una dilución 1:1000 en PBS-T-L. Después de tres lavados de 5 min con PBS-T la membrana se incubó durante 1 h con anticuerpos de cabra conjugados con peroxidasa, frente a anticuerpos de conejo (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) en una dilución 1:5000 en PBST-L. Seguidamente se efectuaron 3 lavados con PBS-T, y después uno sólo de 5 min con PBS.

Las membranas se visualizaron mediante 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, Sigma, St. Louis, Estados Unidos). Se añadieron 5 gotas de 1 % AEC (diluido en N,N dimetilformamida) a 5 mL de tampón acetato 0,05 M pH 5,5. Se añadieron 5 gotas de peróxido de hidrógeno 0,3 % (Sigma, Steinheim, Alemania) a la solución anterior y se mezcló bien. Finalmente se incubó durante 10-15 min a temperatura ambiente y se detuvo la reacción con agua destilada.

La membrana se escaneó y se realizó un análisis semicuantitativo en base a la intensidad de reacción detectada para cada cepa. Para el análisis se utilizó el programa informático *Quantity One*. Con estos datos se calculó el **porcentaje de semejanza** de señal entre las cepas y los controles positivos (en unos casos *V. harveyi* Lg16.00 y en otros *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01):

Porcentaje de semejanza = Intensidad media de la cepa muestreada x 100 / Intensidad media del control positivo.

Para el siguiente paso de selección (capacidad de las cepas de inhibir el crecimiento de los patógenos), se utilizaron aquellas cepas que mostraron una semejanza igual o superior con los patógenos de al menos el 75 %.

2.3. Estudio de la capacidad antagonista de las cepas seleccionadas sobre el crecimiento de *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*

Las 138 cepas reactivas frente los patógenos se sometieron a ensayos de inhibición competitiva mediante la técnica de difusión en el agar (Rattanachuy *et al.*, 2010) con modificaciones. Para ello sobre una placa con TSAs se añadieron 100 µL de una suspensión de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 o *V. harveyi* Lg16.00 ajustada a una turbidez 0,5 McFarland (que corresponde a una suspensión aproximada de 1,5 x

10^8 ufc/mL de *Escherichia coli*), distribuyéndose sobre la superficie mediante un asa de Digralesky (**Figura 5**). Posteriormente, mediante la boca de una pipeta Pasteur de vidrio estéril se hicieron varios pocillos de 5 mm sobre la superficie del agar. Seguidamente se adicionó en cada pocillo la cepa a estudiar resuspendida en TSBs a una D.O. de 1 a 600nm. Las muestras se incubaron a 22 °C durante 24 h en aerobiosis. La actividad bactericida se detectó por la presencia de una zona de inhibición del crecimiento del patógeno alrededor del pocillo, midiéndose el ancho del halo (**Figura 6**). Se consideró que existía inhibición cuando el ancho del halo fue mayor a 2 mm (Sieladie *et al.*, 2011; Deep y Kundu, 2015).

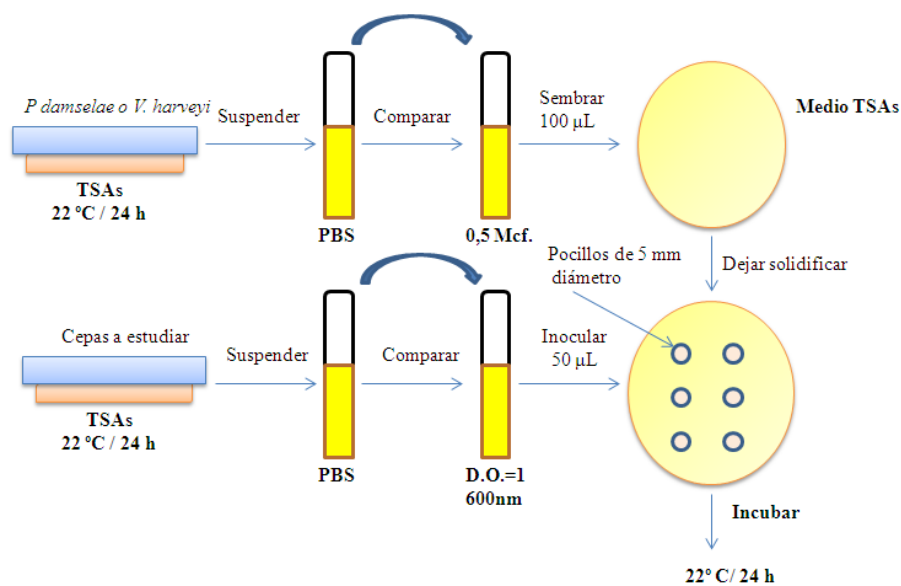


Figura 5. Esquema de la metodología seguida para la evaluación de la actividad bactericida de cada una de las cepas frente *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg 41.01 y *V. harveyi* Lg16.00.



Figura 6. Inhibición de *V. harveyi* Lg16.00 por la cepa DFC12.2

2.3. Selección de cepas con proteínas antigénicamente similares a *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*

Con las 12 cepas que mostraron antagonismo con alguno de los patógenos, se obtuvieron las fracciones proteicas de la membrana externa como se ha explicado en el apartado 1.7.1. Se realizó una electroforesis de gel de acrilamida usando como controles proteínas de membrana externa tanto de *V. harveyi* Lg16.00 como de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01. Todas las muestras se corrieron a 250 V hasta que las proteínas habían migrado por el gel. Los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para la realización de *Western blots* enfrentándose las membranas con suero de lenguados inmunizados frente a *V. harveyi* Lg16.00 o a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 tal como se describe en el apartado 1.7.5. La existencia de bandas reactivas se reveló con TMB. Para los experimentos *in vivo* se seleccionaron las cepas que mostraron bandas reactivas coincidentes con algunas de las bandas que presentaron los patógenos estudiados.

2.4. Identificación de las cepas potencialmente probióticas

Para la identificación de las cepas se cultivaron en medio TSAs a 22 °C durante 24 h. Pasada la incubación se tomó una colonia y se resuspendió en 100 µL de agua molecular esterilizada. Se calentó a 100 °C durante 15 min y se añadieron 900 µL de agua molecular estéril a cada tubo. Se centrifugó durante 5 min a 20.500 ×g y se recogió el sobrenadante en un tubo estéril.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 50 µL, utilizando tubos estériles con capacidad para 0,2 mL. La mezcla de PCR contenía 1,25 U *Dream Taq DNA polymerase* (Thermo Scientific, Madrid, España), 20 µM Tris-HCl (pH 8,5), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (dinucleótidos trifosfato), 5 pmol de cada cebador, agua de PCR esteril, pura y libre de ADNasa, y 1 µL de de cada muestra. Se usaron cebadores universales del gen ARNr 16S, BACT0008 (5`AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3`) (Hicks *et al.*, 1992) y BACT1492 (5`GGTTACCTTGTTACGACTT 3`) (Kim y Austin, 2006), para obtener secuencias con aproximadamente 1.400 pares de bases y que permitan las mejores comparaciones posibles con la base de datos del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los ciclos de PCR se llevaron a cabo en un termociclador *Unocycler* (VWR) y se detallan en la **Tabla 16**.

Los productos amplificados tras la PCR, se comprobaron mediante electroforesis con voltaje constante (100 V) durante 40 min en un gel de agarosa al 1,5 % en un tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X, en el que se incluyó un patrón de pesos moleculares *GeneRuler 100 pb Plus DNA ladder* (Thermo Scientific). Los amplicones resultantes se secuenciaron en una empresa externa (Macrogen Korea Europe) mediante el primer 309F (5`ATCCCTACGGGAGGCWGCAG3`) y la secuencia que resultó (~500 pb) se comparó con las secuencias del NCBI usando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

Tabla 16. Etapas de la PCR para la secuenciación del ADN de las cepas ensayadas. Temperatura de la tapadera: 112°C

Etapa	Temperatura	Tiempo	
Inicio de la PCR	95 °C	2 min	
Desnaturalización	95 °C	30 s	35 ciclos
Alineamiento	52 °C	40 s	
Elongación	72 °C	90 s	

2.5. Determinación de la inocuidad de las cepas seleccionadas y su capacidad para inducir la producción de anticuerpos en *Solea senegalensis*

En este ensayo se probó la posible patogenicidad de 5 cepas seleccionadas como potencialmente probióticas en base a su capacidad de inhibición del crecimiento de patógenos y a su capacidad de producir antígenos comunes a los patógenos: **5-10-11** (reactiva frente a *V. harveyi*), **DFC12.2** (reactiva frente a *V. harveyi* y *P. damsela*), **DCF12.9** (reactiva frente a *V. harveyi* y *P. damsela* subsp. *piscicida*), **DFC12.10** (reactiva frente a *P. damsela* subsp. *piscicida*) y **PLSW5** (reactiva frente a *P. damsela* subsp. *piscicida*).

Se usaron 45 ejemplares de *Solea senegalensis* de 50 a 100 g de peso en grupos de 8 peces por cepa y un grupo control con 5 peces, que se mantuvieron en las instalaciones Grice-Hutchinson de la Universidad de Málaga. La temperatura media del agua fue de $20,5 \pm 4,4$ °C y la salinidad de 35 g/L. Los peces estuvieron en un circuito cerrado con sistema de filtros biológicos, en condiciones de baja luminosidad y en aireación constante. Los peces se alimentaron con pienso comercial (Skretting, Burgos,

España) con una dosis diaria equivalente al 1 % de la biomasa de los peces. Periódicamente se controló el nivel de nitratos en el agua y la temperatura.

Las bacterias se cultivaron en aerobiosis en TSAs a una temperatura de 22 °C durante 24 h. Posteriormente, se ajustó la suspensión bacteriana a una concentración bacteriana de 10^9 ufc/mL, inoculándose intraperitonealmente 0,1 mL por cada 50 g de pez. Después de 30 días se sacrificaron 3 peces de cada grupo para extraer sangre y medir el título de anticuerpos en el suero, y para tomar muestras internas de los peces. El resto de individuos se reinoculó con una suspensión bacteriana como en el inicio del ensayo. Finalmente, a los 51 días del inicio del experimento, se sacrificaron todos los peces completando la obtención del suero de todos los peces tal como se comenta en el **apartado 1.5**. Se analizó el título de anticuerpos de todos los sueros y si existían reacciones cruzadas con los patógenos mediante la técnica de ELISA. También se utilizaron para determinar la existencia de proteínas inmunorreactivas con reacción cruzada mediante electroforesis 2D como se comenta en el **apartado 1.7.4**.

En todos los peces sacrificados se observó el aspecto de hígado, riñón y bazo de para evaluar la salud de los peces y se tomaron muestras de estos órganos, sembrándose en TSAs a 22 °C por 24 h para determinar la presencia de las cepas inoculadas. Si crecían colonias en las placas, estas se identificarían mediante por secuenciación del fragmento ribosómico 16S tal como se ha descrito en el **apartado 2.4**.

2.6. Detección de las proteínas de las cepas seleccionadas que generan reacción cruzada con las cepas patógenas

Se realizó un *Western blot* 2D con las proteínas de membrana externa de las cepas **DCF12.2**, **DCF12.9**, **DCF12.10** y **PLSW5**, tal como se detalla en el **apartado 1.7.5.**, para analizar la existencia de reacciones cruzadas con los sueros de peces inmunizados frente *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01 o *V. harveyi* Lg16.00. Para cada inmunoensayo se utilizaron las cepas que inhibieron el crecimiento del patógeno del suero inmunizado.

Para ello se comparó el gel 2D con la membrana del *Western blot* realizada con las mismas muestras, solapando las dos imágenes con el programa informático *Quantity One*. Las manchas protéicas más inmunorreactivas se mandaron a secuenciar mediante espectrometría de masas al Servicio Central de Investigación de la Universidad de

Córdoba.

2.7. Estudios complementarios de las cepas seleccionadas como potencialmente probióticas

Se estudió la susceptibilidad de las cepas **DCF12.2**, **DCF12.9**, **DCF12.10**, **PLSW5** a diferentes antibióticos, y su supervivencia en distintas condiciones ambientales. Estos estudios permitieron conocer el potencial de cada cepa para ser utilizadas como probióticos en instalaciones acuícolas, teniendo en cuenta tanto la capacidad de supervivencia en el agua de mar, como las condiciones de almacenamiento y de administración. La evaluación en presencia de bilis se realizó exclusivamente con la cepa **DCF12.2**.

2.7.1. Determinación de la susceptibilidad de las cepas frente antibióticos

Se procedió a evaluar la resistencia a diferentes antimicrobianos de las cepas seleccionadas. La resistencia/sensibilidad ante el antibiótico se midió con el método de difusión en placa (Bauer *et al*, 1966). Habitualmente es un método cualitativo que se basa en el halo de inhibición que aparece alrededor del disco clasificando los microorganismos como sensibles (S), intermedios (I) o resistentes (R) según sea la eficacia obtenida por el agente antimicrobiano frente al microorganismo.

Las diferentes cepas se sembraron en TSAs a 22 °C durante 24 h. Posteriormente las diferentes cepas crecidas en TSAs se inocularon en tubos con PBS estéril hasta obtener una densidad óptica McFarland de 0,5 (Hindler, 1992). La suspensión se sembró sobre placas de Mueller Hinton con un hisopo estéril de manera homogénea. Pasados 15 min se dispusieron los diferentes discos de antibióticos (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) distribuidos uniformemente (4-5 por placa). En la **tabla 17** se resumen los antibióticos y concentraciones empleadas en este ensayo. Las placas se incubaron a 22 °C durante 24 h, tras lo cual se midieron los halos de inhibición creados en torno a cada uno de los discos. Las cepas se clasificaron como resistente (R), intermedio (I) o susceptibles (S) dependiendo del diámetro de los halos (Bauer *et al.*, 1966; Giono, 1983). Si no existen datos para el antibiótico en cuestión, la susceptibilidad de la cepa se evaluó comparando su diámetro con las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, CLSI, 2002).

Tabla 17. Concentración ($\mu\text{g}/\text{disco}$) de cada uno de los antibióticos que se dispusieron en el antibiograma.

Antibiótico	Concentración ($\mu\text{g}/\text{disco}$)
Ácido nalidixico	30
Amoxicilina	25
Ampicilina	10
Cloranfenicol	30
Enrofloxacina	5
Eritromicina	15
Estreptomicina	25
Gentamicina	10
Oxitetraciclina	30
Sulfametoxazol	25
Tetraciclina	30

2.7.2. Supervivencia en agua de mar

En este estudio se evaluó la supervivencia de las cepas en agua de mar con la finalidad de observar la viabilidad de las cepas para su posible administración por baño. Para ello se suspendieron los microorganismos a una concentración final de 10^7 ufc/mL en 50 mL de agua marina estéril y se incubaron a 22 °C. Al inicio y a los días 1, 2 y 5 se tomaron muestras del agua y se realizaron diluciones seriadas en solución salina. Estas se sembraron en TSAs y se incubaron durante 24 h a 22 °C. Tras la incubación se hizo el recuento de las colonias crecidas.

2.7.3. Supervivencia a 4 °C

Se evaluó la supervivencia de los probióticos potenciales en frío con la finalidad de conocer su capacidad de almacenaje y transporte en estas condiciones antes de ser administradas a los peces. Para ello se suspendieron los microorganismos a una concentración final de 10^7 ufc/mL en 50 mL de PBS estéril y se incubaron a 4 °C. Al inicio y a los días 1, 2 y 5 se tomaron muestras de la suspensión y se realizó el recuento de células cultivables tal como se ha explicado en el apartado anterior.

2.7.4. Supervivencia a la liofilización

La **liofilización** es un proceso en el que se congela una sustancia y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original mediante sublimación. La liofilización es una de las vías de conservación de las cepas a largo plazo y temperatura ambiente, siendo el objetivo de este apartado conocer la viabilidad de las cepas seleccionadas a este proceso de conservación.

Las cepas fueron sembradas en medio TSAs a 22 °C durante 24 h. Una vez crecidas, se recogió la masa bacteriana contenida en una placa con un portaobjetos estéril, y se le aplicó distintos tratamientos:

(1) **Bacterias sin crioprotector.** La masa bacteriana recogida se congeló directamente a -80 °C durante 42 h.

(2) **Medio crioprotector I.** La masa bacteriana se resuspendió en 1,5 mL de un medio compuesto por Tris-HCl 0,5M (pH 7,5), 10 % leche desnatada, 20 % glicerol, y se congeló a -80 °C durante 42 h.

(3) **Medio crioprotector II.** La masa bacteriana se resuspendió en 1,5 mL de un medio compuesto por extracto de levadura 5 g/L, peptona 5 g/L, 750 mL de agua destilada, 250 mL de agua de mar (pH 7,5) y se congeló a -80 °C durante 42 h.

Todas las muestras se liofilizaron durante 48 h en liofilizador *FTS Systems Flexy-Dry* (Sp Scientifics, Gardiner, Estados Unidos). Tras la liofilización las muestras se resuspendieron en 20 mL de medio TSBs y se incubaron a 22 °C durante una semana. A continuación se extrajo un inóculo de cada muestra y se sembró en TSAs, incubándose durante 24 h a 22 °C. Se consideró que las bacterias sobrevivieron al proceso de liofilización si en las placas aparecían colonias de la cepa.

2.7.5. Supervivencia en el pienso.

El estudio de la supervivencia en el pienso de los peces es fundamental para conocer la viabilidad de los microorganismos para su administración por vía oral, y la posibilidad de almacenamiento de la mezcla pienso-probiótico sin que el número de microorganismos decrezca de una manera crítica. Para ello se estudiaron dos vías distintas de administrar el probiótico:

- **Administración directa sobre el pienso** (Skretting, Burgos, España), añadiendo gota a gota, 6 mL de suspensión bacteriana (10^8 ufc/mL) en solución salina sobre 30 g de pienso, y agitando hasta que el pienso absorba todo el líquido.

- **Administración con alginato sódico.** El alginato sódico encapsula al microorganismo impidiendo su deshidratación, y lo protege frente al ataque ácido del estómago. Para la preparación se utilizó 0,6 mL de suspensión bacteriana (10^8 ufc/mL) mezclada con 3 mL de alginato (Sigma, Steinheim, Alemania) al 0,5 %. La mezcla se roció sobre 30 g pienso y luego se añadió 2,4 mL de CaCl_2 50 mM (Sigma, Steinheim, Alemania) para gelificar la mezcla.

Los piensos se mantuvieron a -20 °C, 4 °C y 22 °C, tomándose muestras los días 0, 1, 2 y 5. Las muestras almacenadas a -20 °C únicamente se analizaron a tiempo final. Para la toma de muestras se empleó 1g de pienso que se resuspendió en 10 mL de PBS estéril. Seguidamente, esta mezcla se homogeneizó durante 5 min (Aes Laboratoire Easy Mix, Marcy-l'Étoile, Francia) y la suspensión resultante se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min a $300 \times g$, recuperándose el sobrenadante para su análisis. La concentración bacteriana se determinó empleando diluciones seriadas en PBS estéril e incubando en placas de TSAs a 22 °C durante 24h. Finalmente se hizo el recuento de colonias bacterianas que crecieron en las placas de TSAs.

2.7.6. Determinación de las actividades enzimáticas

Se evaluaron las características enzimáticas de las cepas **DCF12.2**, **DCF12.9**, **DCF12.10** y **PLSW5**. Las características analizadas fueron las siguientes:

Actividad lecitinasa: Permite comprobar si pueden actuar sobre la lecitina. Se inocularon las cepas mediante una estría en medio de agar yema de huevo (Ver **Anexo 1**) y se incubaron durante 48 h 22 °C. Las cepas bacterianas con actividad lecitinasa formaron una zona opaca alrededor del crecimiento bacteriano como resultado de la hidrólisis de la lecitina de la yema de huevo.

Actividad lipasa: Algunas bacterias excretan lipasas extracelulares con la capacidad de hidrolizar triglicéridos en ácidos grasos y glicerol. Se sembraron las cepas a ensayar realizando una estría de cada una de las cepas en medio de agar yema de huevo (Ver **Anexo 1**). Las placas se incubaron durante 48 h a 22 °C. Una reacción lipasa

positiva se manifiesta mediante un precipitado cristalino de oleato cálcico en torno al crecimiento bacteriano.

Actividad caseinasa: Mide la capacidad de producción de la proteasa que degrada a la caseína, proteína de la leche, liberándose aminoácidos. Cada una de las cepas se sembró mediante una estría en medio Agar Leche (Ver **Anexo 1**) y se incubó 48 h durante 22 °C. Las cepas con capacidad de hidrolizar la caseína tendrán un halo transparente en torno al crecimiento microbiano.

Actividad gelatinasa: La prueba de la gelatinasa pone de manifiesto la producción de dicha enzima proteolítica por determinados microorganismos, capaces de actuar sobre la gelatina hidrolizándola en los aminoácidos que la componen. Las bacterias se sembraron mediante estría en agar gelatina (Ver **Anexo 1**) y se incubaron durante 48 h a 22 °C. La presencia de un halo transparente en la región de crecimiento bacteriano indicó la hidrólisis de la gelatina.

Actividad amilasa: Se usó para determinar la capacidad de las cepas de excretar alfa-amilasas para poder hidrolizar el almidón en oligosacáridos o monosacáridos. Los microorganismos se sembraron por estría en una placa de Agar Almidón (Ver **Anexo 1**) y se incubaron 22 °C durante 48 h. Para comprobar la hidrólisis del almidón se cubrió la superficie de la placa con lugol durante 10 min. Si el almidón ha sido hidrolizado, los productos no se unirán al lugol y por tanto presentará un halo de degradación (marrón o transparente), mientras que la zona con almidón tendrá un color púrpura.

2.7.7. Evaluación del crecimiento en diferentes pH

Se evaluó la tolerancia a diferentes pH de cada una de las cepas potencialmente probióticas. Se usaron cultivos en TSBs de cada una de las cepas y se lavaron por centrifugación 2 veces con solución salina (3.000 ×g, 15 min, 4 °C). Se ajustaron las cepas potencialmente probióticas a una concentración de 10⁶ ufc/mL y se incubaron en tubos con TSBs y pH desde 1,0 a 9,0 durante 24 h. Se consideró que presentaban crecimiento aquellos tubos que mostraron una turbidez con una densidad óptica superior a 0,5 medida a 600 nm.

2.7.8. Evaluación del desarrollo de la cepa *Vibrio proteolyticus* DCF12.2 en presencia de bilis y diferentes pH

Se preseleccionó la cepa **DCF12.2** para su estudio *in vivo* en *S. senegalensis* tras los procesos de selección anteriores debido a sus características favorables. Esta cepa no

es patógena en peces, posee capacidad antagónica frente *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00, tiene antígenos con reacción cruzada frente a los dos patógenos, es viable en condiciones de almacenamiento, produce enzimas extracelulares, no es resistente a ciertos antibióticos, y crece a un pH relativamente ácido. Asimismo, los peces inmunizados con la cepa **DCF12.2** presentaron un título de anticuerpos alto frente la cepa inmunizada.

Como paso previo en el estudio del uso oral de la cepa **DCF12.2** se evaluó la tolerancia tanto a la bilis como a diferentes pH. Se usaron cultivos en TSBs y se lavaron por centrifugación 2 veces con solución salina (3.000 ×g, 15 min, 4 °C). Se preparó una suspensión bacteriana de esta cepa y se ajustó a una concentración de 10⁶ ufc/mL. Se prepararon tubos con pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 y 7,0; y por otra parte tubos con diferentes concentraciones de bilis bovina (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) a una concentración de 0,3, 0,5, 1, 3 y 5 % (p/v) (Thankappan *et al.*, 2015 con modificaciones). Los tubos sin sales biliares se utilizaron como controles. Las bacterias viables se contaron en placas de TSAs a 1 h, 2 h y 3 h. Se consideró que la cepa es resistente a pH ácido cuando es viable durante al menos 2 h a un pH 3,0 (Arihara *et al.*, 1998).

2.8. Tratamiento de los datos

Los análisis estadísticos se realizaron empleando el software XLSTAT (Addinsoft, España). La normalidad y homocedasticidad de los datos se comprobó mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. Los diferentes tratamientos se compararon mediante un análisis de varianza ANOVA de una vía, con el ajuste de Tukey y Dunnett cuando los datos cumplían los requisitos de normalidad y homocedasticidad. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas asumiendo $p < 0,05$.

3. Efecto de la cepa *Vibrio proteolyticus* DCF12.2 sobre el sistema inmunitario de lenguados y protección frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la cepa **DCF12.2**, administrada al pez por diferentes vías, sobre el sistema inmune adaptativo e innato del lenguado. Asimismo se evaluó el grado de protección de los peces tratados con el potencial probiótico mediante infecciones experimentales con las cepas virulentas de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00.

Para los ensayos se utilizaron lenguados (*Solea senegalensis*) de 15-20 g. Los peces se aclimataron una semana antes del experimento en las instalaciones Grice-Hutchinson de la Universidad de Málaga. Los peces se mantuvieron en tanques de 500 L con un sistema cerrado de agua de mar sometida a aireación, y paso por filtros biológicos. La temperatura del agua durante el experimento fue de $16,5 \pm 3,5$ °C y salinidad constante (35 g/L). Los ejemplares se alimentaron diariamente con pienso comercial *Gemma* en cantidades diarias equivalentes al 1 % del peso total de los peces.

Los peces se separaron en 4 tanques de 500 L con 90 peces/tanque. Los peces de cada tanque se sometieron a distintas vías de administración de *V. proteolyticus* **DCF12.2**:

- **Inyección por vía intraperitoneal.** La cepa **DCF12.2** se cultivó en TSAs y se resuspendió en PBS estéril a una concentración bacteriana de 10^9 ufc/mL. Seguidamente los peces con 100 ppm de aceite de clavo disuelto en el agua. La suspensión de bacterias se inoculó por vía intraperitoneal utilizando 0,1 mL por pez. Este tratamiento fue usado como control positivo en la producción de anticuerpos.

- **Administración por baño.** Los peces se sometieron a un baño con una dilución 1:100 de la cepa **DCF12.2** en agua de mar durante 1h y con aireación, siendo la concentración final de bacterias de 10^7 ufc/mL. El tratamiento se repitió a los mismos peces después de 15 días.

- **Administración por el pienso.** Los peces se alimentaron con pienso al que se añadió una suspensión de la cepa **DCF12.2** justo antes de su administración a los peces (1 mL de suspensión por cada 10 g de pienso). La concentración de probióticos en el pienso fue de 10^9 ufc/g. Este preparado se administró inmediatamente a los peces. Los

peces se alimentaron con esta mezcla en cantidades diarias equivalentes al 1 % de la biomasa de los peces. El tratamiento se realizó durante 28 días, alternando 5 días con tratamiento con dos días de alimentación con pienso sin bacterias.

- **Peces controles.** Este grupo de peces permaneció en las condiciones de cultivo originales sin contacto con la cepa **DCF12.2**.

Al inicio del experimento, así como a los días 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 y 56 se sacrificaron 5 peces por tratamiento, mediante inmersión con aceite de clavo (200 ppm) y posterior desangrado. El suero extraído se utilizó para determinar el título de anticuerpos en suero y mucus de piel e intestino, expresión de genes implicados en la respuesta inmune innata, así como el estudio de la microbiota intestinal por DGGE. A los 30 días después del comienzo de la administración de los probióticos se realizaron infecciones experimentales.

3.1. Detección de anticuerpos

Se determinó el título de anticuerpos en el suero, mucus intestinal y de la piel en peces a los que se ha inoculado la cepa **DCF12.2** por las distintas vías especificadas anteriormente. Esta determinación se llevó a cabo a los 7, 14, 21, 28 y 56 días del tratamiento.

El mucus de la superficie del pez y del intestino se retiró con un portaobjetos con cuidado de no arrastrar escamas, y se hizo una mezcla de mucus de los diferentes individuos. Esta mezcla se homogeneizó con PBS estéril (Ver **Anexo 2**). Posteriormente se centrifugó a 300 ×g durante 10 min a 4 °C, seleccionando el sobrenadante. Finalmente, para aumentar su concentración, la muestra se congeló a -80 °C y se liofilizó. El mucus liofilizado se redisolvió en agua químicamente pura y se centrifugó a 300 ×g durante 10 min a 4 °C. Se extrajo el sobrenadante y se midió la concentración proteica mediante el método de Bradford (ver **apartado 1.4.**) y posteriormente se congeló a -80 °C hasta su uso (Guardiola *et al.*, 2014).

Los niveles de IgM se analizaron mediante la técnica de ELISA (Ver **apartado 1.6.**). Los antígenos que se utilizaron en cada una de las placas de ELISA fueron bacterias de la cepa **DCF12.2**, bacterias de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y bacterias de *V. harveyi* Lg16.00. El mucus analizado se utilizó a una concentración proteica de 250 µg/mL, mientras que el suero se diluyó a una dilución 1/500.

3.2. Expresión de genes implicados en la respuesta inmune innata

3.2.1 Extracción de ARN y reversotranscripción a ADNc

En este estudio se evaluó el efecto de las distintas vías de administración de la cepa **DCF12.2** sobre la expresión de genes del hospedador implicados en la respuesta inmune. La expresión se midió a 3 días (efecto a corto plazo) y 28 días después de comenzar el ensayo (efecto a largo plazo).

Para la extracción de ARN se empleó el kit *GeneJET RNA Purification* (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante, partiendo de 30 mg de riñón cefálico. Durante todo el proceso de extracción de ARN se emplearon tubos libres de ARNasa y ADNasa, además de agua tratada libre de nucleasas.

La calidad del ARN se comprobó mediante electroforesis en geles de TBE 0,5x con agarosa al 0,7 %. El ARN se determinó con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos) mediante la relación 260/280. Los valores deben estar entre 1,9 y 2, siendo más puro el ARN cuanto está más cerca de 2. Se hicieron los cálculos para conseguir una cantidad de 2 µg de ARN y se realizó un tratamiento con ADNasa I (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos) a una concentración de 1 U por µg de ARN durante 30 min a 37 °C para eliminar restos de ADN. Posteriormente se añadió EDTA (Life Technologies, España) a una concentración de 50 mM y se incubó durante 10 min a 65 °C de acuerdo con el protocolo de la casa comercial. La reverso transcripción se llevó a cabo mediante el kit *First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos) a partir de 1 µg de ARN y usando primers de oligo (dT)18. Se usó como molde 1 µL de cada reacción de síntesis de ADNc en la qPCRs para analizar los genes de *S. senegalensis* que se encuentran en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Genes estudiados en el trabajo de expresión génica

Gen	Código	Referencia
SISTEMA INMUNE INNATO		
<i>Inmunidad humoral</i>		
Componente 3 del complemento	C3	Prieto-Álamo <i>et al.</i> , 2009
Componente 7 del complemento	C7	Prieto-Álamo <i>et al.</i> , 2009
Lisozima C	C-LYS	Fernández-Trujillo <i>et al.</i> , 2008
Lisozima G	G-LYS	Salas-Leiton <i>et al.</i> , 2010
Interleucina 10	IL-10	Urán <i>et al.</i> , 2008
<i>Inmunidad celular</i>		
Factor potenciador de células Natural Killer	NKEF	Prieto-Álamo <i>et al.</i> , 2009
Sequestosoma 1	SQSTM-1	Prieto-Álamo <i>et al.</i> , 2009
ESTRÉS		
Glutación peroxidasa	GPx	Teles <i>et al.</i> , 2011
NADPH oxidasa	NADPHox	Teles <i>et al.</i> , 2011
Proteína de choque térmico 70	HSP70	Salas-Leiton <i>et al.</i> , 2010
Proteína de choque térmico 90	HSP90AB	Manchado <i>et al.</i> , 2008
Proteína de choque térmico gp96	GP96	Osuna-Jiménez <i>et al.</i> , 2009
GENES DE REFERENCIA		
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa 1	GADPH1	Osuna-Jiménez <i>et al.</i> , 2009
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa 2	GADPH2	Manchado <i>et al.</i> , 2007

3.2.2. Realización de PCR a tiempo real (qPCR)

Las amplificaciones de qPCR se realizaron por triplicado en placas de 96 pocillos en un volumen final de 10 μ L. La mezcla contenía 5 μ L de *SsoAdvanced SYBR Green Supermix* (Biorad, Hercules, Estados Unidos), 0,5 μ L de cada conjunto de cebadores (10 mM), 1 μ L de ADNc molde y 3 μ L de agua ultrapura. Las medidas de la qPCR se llevaron a cabo por triplicado en placas de 96 pocillos de PCR y se ejecutaron en un termociclador de qPCR C1000 Touch (Biorad, España) con el módulo óptico CFX96 (Biorad, España) para las mediciones de fluorescencia. Las reacciones de amplificación se realizaron con una desnaturalización inicial de 95 $^{\circ}$ C durante 30 s,

seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 5 s y 51 °C durante 15 s. Para confirmar la amplificación específica en el producto de PCR, al terminar los 40 ciclos, se realizó el análisis de la curva de fusión partiendo de una temperatura inicial de 65 °C con un incremento de 0,5 °C por cada ciclo de 5 s hasta llegar a una temperatura final de 95 °C.

Para la normalización de los valores de qPCR, se escogieron como genes de referencia aquellos que en la qPCR presentaron valores de Ct similares a lo largo de los diferentes tratamientos. Los genes de referencia empleados en este trabajo fueron los genes que codifican para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 1 y 2 (GADPH 1 y 2) (Tabla 19).

3.2.3. Tratamiento de los datos mediante el método $2(-\Delta\Delta Ct)$

Los datos obtenidos tras las reacciones de qPCR se analizaron empleando el programa iCycler iQ v3.0 de BioRad. Los valores relativos de expresión de ARNm se calcularon usando el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ según Pfaffl (2001). Este método asume que las eficiencias de amplificación del gen de referencia y de estudio son cercanas al 100 %. En primer lugar, se normalizaron los valores de Ct obtenidos de los genes de estudio y referencia tanto de la muestra tratada como en la muestra control. La normalización del gen a estudiar respecto al gen de referencia permite compensar cualquier diferencia debido a la cantidad de muestra empleada en los ensayos:

$$\Delta C_{T(\text{tratado})} = C_{T \text{ gen de estudio}} - C_{T \text{ gen de referencia}}$$

$$\Delta C_{T(\text{control})} = C_{T \text{ gen de estudio}} - C_{T \text{ gen de referencia}}$$

En segundo lugar, se normalizó el valor de Ct *de la muestra tratada con la muestra control*:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{tratado})} - \Delta C_{T(\text{control})}$$

Finalmente, se aplica la expresión:

$$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

El resultado indica el incremento o disminución relativa en el número de transcritos de un gen perteneciente a un individuo tratado con respecto al mismo gen de un individuo control sin tratar y normalizado al gen de referencia.

3.3. Análisis de la microbiota de lenguados tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2

Para el estudio de la diversidad de la microbiota en el intestino y en la piel de los lenguados tratados con la cepa **DCF12.2**, se extrajo el ADN del intestino y de piel, y se amplificó una región altamente conservada que codifica al ARNr 16S. Posteriormente, se empleó la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) para estudiar la diversidad entre las distintas muestras. Las técnicas utilizadas se indican a continuación.

3.3.1. Toma de muestras

- Microbiota de intestino en peces alimentados con *V. proteolyticus*

Con estos análisis se comparó la microbiota intestinal de los peces alimentados con la cepa **DCF12.2** respecto a la microbiota de los peces controles. Se utilizaron los intestinos de 5 peces por tratamiento y tiempo de muestreo. Las muestras se recogieron a los 14 y 28 días del comienzo de la alimentación con la cepa. El contenido del lumen de cada intestino se extrajo en condiciones de esterilidad con un porta estéril. Posteriormente se tomó una muestra de 50 mg del contenido de cada uno de los intestinos y se extrajo el ADN de cada una de las muestras siguiendo la metodología basada en la precipitación salina con modificaciones (Martínez *et al.*, 1998).

- Microbiota de la piel de peces inoculados por baño con *V. proteolyticus*

Se realizó un estudio comparativo de la microbiota de la piel entre los peces inoculados con la cepa **DCF12.2** por baño y los peces controles. Se utilizaron mezclas de mucus de 5 peces por tratamiento y tiempo de muestreo. El análisis de la microbiota del mucus de la piel se realizó a 0, 1, 2, 3, 7, 14 y 56 días, tomándose un total 300 µL de mezcla del mucus de la piel por cada tiempo de muestreo. Para la posterior extracción de ADN se utilizó la metodología descrita por Martínez *et al.*, (1998) con modificaciones.

3.3.2. Extracción de ADN

Las muestras se mezclaron con 900 µL de tampón de resuspensión (Ver **Anexo 2**). Posteriormente se mezclaron 300 µL de esta solución con 300 µL de tampón de lisis II (Ver **Anexo 2**) y se agitaron durante un minuto para lograr una mezcla completa. Posteriormente se añadieron 32 µL de solución de precipitación (NaCl 6M) y 5-10 µL de proteinasa K no molecular (20 mg/mL) (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) y se incubaron a 37 °C durante 18 h. Se adicionaron 160 µL de solución de precipitación

agitándose vigorosamente durante 15 s. Se introdujeron los tubos en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 12.000 \times g durante 6 min. Se transfirieron cuidadosamente 600 μ L del sobrenadante conteniendo el ADN genómico a otro vial añadiéndose un volumen de isopropanol. Los tubos se invirtieron cuidadosamente varias veces y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 min. Las muestras sometieron a una centrifugación a 18.000 \times g durante 6 min, se desechó el sobrenadante y se lavó con 500 μ L de etanol 70 % frío. Tras centrifugar a máxima velocidad durante 2 min, se conservó el precipitado y se secó a temperatura ambiente durante 2 h. El ADN extraído se resuspendió en 100 μ L de agua químicamente pura, estéril y libre de ADNasas y ARNasas.

Para eliminar impurezas de esta muestra que pudieran inhibir su amplificación se usó 20 μ L de la solución stock a la que se le añadió 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 6,8) y 2 volúmenes de isopropanol al 95 %. Tras incubar en hielo durante 10 min se centrifugó 6 min a 12.000 \times g, se eliminó el sobrenadante y se repitió el paso de precipitación en 50 μ L de etanol al 70 %. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar la muestra a temperatura ambiente. Finalmente el ADN se disolvió en 20 μ L de agua químicamente pura, estéril y libre de ADNasa. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

Se comprobó la pureza y concentración de ADN extraído mediante la relación de las medidas de absorbancia A260nm/A280nm mediante el uso de un espectrofotómetro *NanoDrop™ 1000* (Thermofisher Scientific, Delaware, Estados Unidos) considerándose valores entre 1,8 y 2 como adecuados para muestras de ADN. Las muestras de ADN se diluyeron para ajustar a una concentración de 50 ng/ μ L con la que se realizó la posterior reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.3.3. Amplificación del ADN codificante del ARNr 16S y análisis mediante DGGE

El ADN se amplificó tal como se detalla en el **apartado 2.4.** utilizando cebadores universales capaces de unirse a la región altamente conservada que codifica al ARNr 16S, concretamente el 309F (5' ATCCCTACGGGAGGCWGCAG -3') y 677R-CG (5'-CGGGGCGGGGGCACGGGGGGATMTCTACGCATTTACCGCTAC -3') (Sheffield *et al.*, 1989; Muyzer *et al.*, 1993), para obtener fragmentos de unas 400 pb de longitud. El cebador 677 posee una cola repetitiva de CG que evita que la hebra se desnaturalice completamente. Las reacciones se llevaron a cabo en un

termociclador y quedan resumidas en el siguiente programa de la **Tabla 19**. Los productos amplificados se comprobaron mediante electroforesis con voltaje constante (100 V) durante 40 min en gel de agarosa al 1,5 % (p/v) en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5 x.

Tabla 19. Etapas de la PCR para la secuenciación por DGGE.
Temperatura de la tapa: 112°C

Etapa	Temperatura	Tiempo	
Inicio de la PCR	94 °C	2 min	
Desnaturalización	94 °C	30 s	35 ciclos
Alineamiento	56°C	30 s	
Elongación	68 °C	30 s	
Fin de la PCR	68 °C	5 min	

3.3.4. Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante

Los amplicones obtenidos del ADN se separaron mediante DGGE de acuerdo a las especificaciones descritas por Muyzer *et al.*, (1993) usando el aparato *D-code Universal Mutation Derection System* (Biorad, Hercules, Estados Unidos). La electroforesis se realizó en geles (dimensiones 200 x 200 x1 mm) de poliacrilamida al 8 % (37.5:1 acrilamida-bisacrilamida) (Biorad, China) usando un gradiente del 30 % al 55 % de urea y formamida para la separación, considerando el nivel 100 % como una solución desnaturalizante que contiene 7 M de urea y 40 % (v/v) de formamida. La electroforesis se realizó durante 5 h a 150 V en 0,5X tampón TAE a una temperatura constante de 60 °C (Sambrook *et al.*, 2001) con 13 µL de los productos de PCR en cada calle. Los geles se tiñeron con nitrato de plata (Sanguinetti *et al.*, 1994).

3.3.5. Análisis de los patrones de DGGE.

Los geles teñidos se escanearon con una resolución de 300 ppi y los patrones de bandas de DGGE se analizaron utilizando el programa FPQuest-Bionumerics 4.5 (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Este programa identifica la posición de cada banda, la intensidad de cada banda y calcula la contribución de la intensidad de cada banda al total de cada muestra. Se determinó el número de bandas de

DGGE (S) que indica el número de especies, la intensidad de cada banda (n_i), y la suma de todas las intensidades de las bandas de la muestra (N) (Fromin *et al.*, 2002). Se agruparon los patrones de bandas mediante la construcción de un dendrograma de Jaccard (Jaccard, 1908).

Para determinar la diversidad estructural de la comunidad microbiana se calcularon los valores ecológicos de riqueza específica (R), índice de diversidad de Shannon (H') y habitabilidad (Rr) (Marzorati *et al.*, 2008). Para la riqueza de especies (R) se asumió que cada banda de DGGE constituye una unidad taxonómica operativa (OTU), para el índice de Shannon (H') la intensidad de las bandas de DGGE es una aproximación de la abundancia relativa.

1. *Índice de diversidad de Shannon (H')* (Shannon y Weaver, 1949), calculado según la expresión:

$$H' = -\sum P_i \ln P_i$$

donde, P_i es la abundancia relativa de la especie i .

2. *Riqueza de especies (R)*, estimada como el número total de bandas en cada calle del gel de DGGE

$$R = \sum b$$

donde b = cada una de las bandas presentes en el gel de DGGE.

3. *Habitabilidad (Rr)*, calculada como el número total de bandas multiplicado por el porcentaje de gradiente desnaturante de urea/formamida del gel necesario para describir la diversidad total de las muestras analizadas (Marzorati *et al.*, 2008).

$$Rr = N^2 \times D_g$$

donde, N representa el número total de bandas en cada calle, D_g = gradiente desnaturante comprendido entre la primera y la última banda de dicha calle.

3.3.6. Secuenciación de bandas de DGGE.

Las bandas predominantes en los geles de DGGE se recortaron para su secuenciación con la punta de pipetas estériles. Se pusieron en 100 μ L de agua químicamente pura y estéril y se incubaron a 4 °C overnight para permitir la difusión del ADN. Se usaron 5 μ L del volumen de la muestra obtenida para la reacción de amplificación tal como se detalla en el **apartado 2.4**. En esta ocasión, el cebador 677R no contó con la cola CG empleada en la PCR previa a la DGGE, siendo su

secuencia (5' - ATMTCTACGCATTTACCGCTAC -3'), en cuanto al cebador 309F permanece invariable (5' ATCCCTACGGGAGGCWGCAG -3'). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador aplicando el programa resumido en la **Tabla 20**. Tras comprobar el producto de PCR en un gel de agarosa, las muestras se enviaron para su secuenciación a *Macrogen Korea Europe*.

Las secuencias resultantes (~500pb) se compararon con las secuencias base de datos del NCBI usando el algoritmo de secuencias BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Las secuencias de la base de datos que mostraron la identidad más alta se usaron para definir su identificación.

Tabla 20. Etapas de la PCR para la secuenciación de bandas de DGGE.
Temperatura de la tapa: 112 °C

Etapa	Temperatura	Tiempo	
Inicio de la PCR	95 °C	2 min	
Desnaturalización	95 °C	30 s	45 ciclos
Alineamiento	64 °C	30 s	
Elongación	72 °C	60 s	
Fin de la PCR	72 °C	5 min	

3.4. Determinación de la supervivencia de peces administrados con probiótico e infectados con *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*

A los 30 días después del comienzo de la administración de los probióticos se realizaron infecciones experimentales con las cepas patógenas para *S. senegalensis*, *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00 para determinar el grado de protección que confiere el uso de estos probióticos administrados en diferentes vías. Una vez anestesiados los peces en aceite de clavo (100 ppm), se inoculó el patógeno por inyección intraperitoneal a 10 peces por grupo, manteniéndose a una temperatura superior de 23 °C, con aireación y salinidad constante (35 g/L), observándose signos de enfermedad y muerte durante 21 días. La eficacia del probiótico fue calculado mediante el porcentaje relativo de supervivencia (RPS):

$$RPS = [1 - (\% \text{ mortalidad en peces tratados} / \% \text{ mortalidad en peces control})] \times 100$$

Se recogieron muestras de hígado y riñón a los peces recién muertos para comprobar si se aislaban de estos órganos internos la cepa inoculada, sembrándose

dichas muestras en TSAs. La dosis empleada para el patógeno *V. harveyi* Lg16.00 estuvo a una concentración de 2×10^6 ufc/g y en *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 de 10^4 ufc/g.

3.5. Tratamiento de datos

Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el software XLSTAT (Addinsoft, España). Los diferentes tratamientos de ELISA y expresión génica se compararon mediante un análisis de varianza ANOVA de una vía, con el ajuste de Tukey, cuando los datos cumplían los requisitos de normalidad y homocedasticidad. La normalidad y homocedasticidad de los datos se evaluó mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. En caso de no cumplirse la asunción de homocedasticidad, se aplicó el test no paramétrico Klustal Wallis. Los valores de transcripción relativa de los genes estudiados se presentaron como promedio del incremento relativo \pm error estándar. Las diferencias significativas entre los índices de diversidad (H'), riqueza de especies (R) y habitabilidad se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas asumiendo $p < 0,05$.

4.- Empleo combinado de la cepa *Vibrio proteolyticus* DCF12.2 y de una vacuna bivalente frente *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*

En este ensayo se evaluó si el uso combinado del probiótico **DCF12.2** y una vacuna bivalente, aumentaba el grado de protección generado por la vacuna frente a las bacterias patógenas, produciendo así un efecto potenciador.

Se emplearon 300 ejemplares de lenguados de 35-40 g que permanecieron durante 52 días en la Planta de Cultivos Marinos de la Universidad de Cádiz. Para el ensayo de vacunación se utilizó una vacuna bivalente compuesta de bacterina y enriquecida con ECP de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00 (Ver **apartado 1.5**). La vacuna se administró a un grupo de 150 peces mediante un baño de 2 h en agua de mar con aireación constante. Para la vacunación se rebajó el nivel de los tanques de cultivo de peces hasta un volumen final de 100 L de agua de mar a una concentración final de 10^7 ufc/mL.

En los días 15, 30, y 52 después de la vacunación se sacrificaron 5 peces por grupo, obteniéndose suero y mucus de piel e intestino según el cronograma especificado en la **Figura 7**, con el objetivo de conocer la cinética de producción de anticuerpos específicos por ELISA y estudiar la microbiota, tanto intestinal como de la piel.

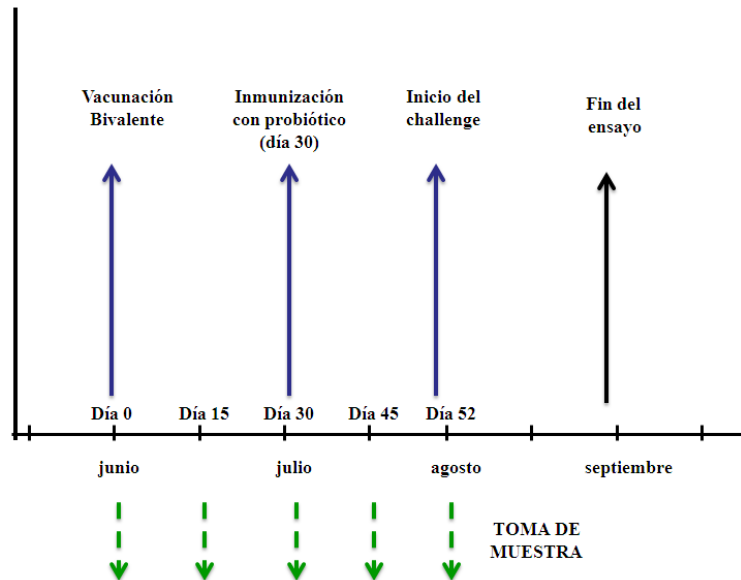


Figura 7. Cronograma del ensayo de evaluación del uso combinado de la bacteria *V. proteolyticus* DCF12.2 y una vacuna bivalente frente *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00.

A día 30 de haber suministrado la vacuna bivalente, la mitad de los peces del experimento (75 peces vacunados y 75 peces no vacunados) se pusieron en contacto con el probiótico mediante inmersión en baño. Para ello *V. proteolyticus* **DCF12.2** se cultivó en placas de TSAs durante 24 h a 22 °C, se recogió la masa bacteriana y se ajustó en PBS a una densidad óptica de 1,5 a 600 nm (10^{10} ufc/mL). Para la inmersión con la cepa los tanques de cultivo de peces se dejaron con un volumen de 100 L de agua de mar, a la que se añadió 5 L de la suspensión de probióticos hasta una concentración final de 10^8 ufc/mL. Se incubó durante 1 h con aireación constante, y transcurrida la hora se empezó a recircular el agua en los tanques. Los peces bañados con probióticos se mantuvieron en un sistema de filtración independiente de los peces no bañados con el probiótico, para así evitar la contaminación entre ambos grupos. De esta forma se obtuvieron 4 grupos de peces sometidos a distintos tratamientos:

- Peces vacunados y tratados con el probiótico.
- Peces vacunados y sin contacto con el probiótico.

- Peces sin vacunar y tratados con el probiótico.
- Peces control

Transcurridos 15 días se transportaron a las instalaciones Grice Hutchinson de la Universidad de Málaga para realizar una infección experimental frente *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00.

4.1. Determinación de anticuerpos en el suero y mucus de los peces

Los niveles de anticuerpos se analizaron mediante la técnica de ELISA, técnica descrita en el **apartado 1.6**. Los antígenos que se utilizaron en cada una de las placas de ELISA fueron bacterias de la cepa DCF12.2, *V. harveyi* Lg16.00 y *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01. Se utilizó una dilución inicial 1:500 de los sueros. En cuanto al mucus de piel, este se retiró de tal como se explica en el **apartado 3.1**. El mucus se utilizó a una concentración inicial de 250 µg/mL.

4.2. Análisis de la microbiota de la piel

La diversidad de la microbiota de la piel de los peces tratado se determinó mediante DGGE, tal como se describe en el **apartado 3.3**. La toma de muestra se realizó a día 0, 15, 30 y 52 desde el inicio del experimento.

4.3. Infecciones experimentales con los patógenos y determinación del grado de protección de los tratamientos

A los 52 días del inicio del experimento, se realizó una infección experimental para determinar la protección adquirida con cada tratamiento, tal como se realizó en el **apartado 3.4**. Se inoculó por vía intraperitoneal una dosis equivalente a 10^4 ufc/g de pez de *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01 y una dosis a 10^5 ufc/g de pez de *V. harveyi* Lg16.00. Los peces inoculados se mantuvieron en circuito cerrado con sistema de filtros biológicos, en condiciones de baja luminosidad, en aireación constante y a una temperatura superior de 23 °C. Los peces se alimentaron con pienso comercial (Skretting, Burgos, España) con una dosis diaria equivalente al 1 % de la biomasa de los peces.

Durante 21 días se hizo seguimiento de los peces, realizando un recuento diario del número de bajas por tratamiento, para poder calcular el porcentaje de protección de los tratamientos realizados.

4.4. Tratamiento de datos

Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el software XLSTAT (Addinsoft, España). Los diferentes tratamientos de ELISA se compararon mediante un análisis de varianza ANOVA de una vía con el ajuste de Tukey, cuando los datos cumplieran los requisitos de normalidad y homocedasticidad. La normalidad y homocedasticidad de los datos se evaluó mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. Para comprobar la existencia de diferencias significativas entre los índices de diversidad (H'), riqueza de especies (R) y habitabilidad se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas asumiendo $p < 0,05$.

RESULTADOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Obtención de anticuerpos de *Solea senegalensis* frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi* e identificación de las proteínas más inmunogénicas

1.1. Obtención de anticuerpos frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* e identificación de las proteínas más inmunogénicas

1.1.1. Titulación de anticuerpos en los lenguados inmunizados

Cuando los lenguados se inocularon por primera vez con los antígenos de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01, no se obtuvo un título significativo de anticuerpos ($p < 0,05$) frente a la bacterina usada como antígeno en los ELISA, pero sí en los peces inoculados por segunda vez (dilución límite 1/64.000) (**Figura 8**). Cuando se utilizaron los ECP como antígeno en los ELISA se obtuvieron títulos significativos de anticuerpos tanto con una inoculación (dilución límite 1/4.000) como con dos inoculaciones (dilución límite 1/16.000) (**Figura 9**).

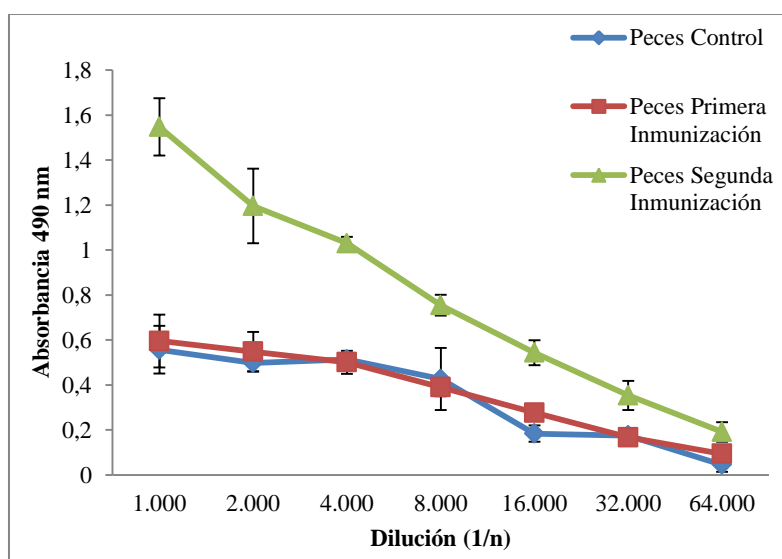


Figura 8. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA frente a la **bacterina** de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 con distintas diluciones de los sueros de peces inmunizados, una y dos veces, con bacterina y ECP de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01, y peces controles.

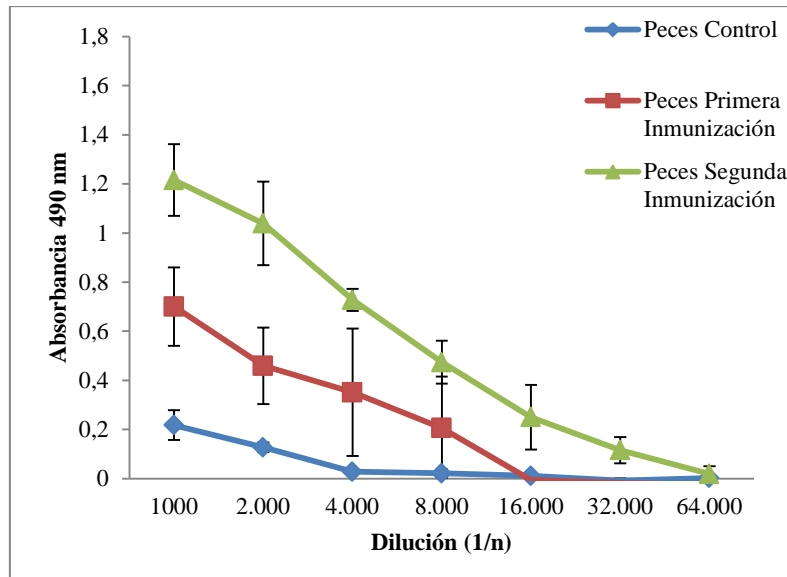


Figura 9. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA frente a los ECP de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 con distintas diluciones de los sueros de peces inmunizados, una y dos veces, con bacterina y ECP de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01, y peces controles.

1.1.2. Detección de proteínas inmunoreactivas mediante electroforesis y Western blot

Mediante la electroforesis bidimensional y los Western blot con los ECP y OMP de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01, se pudo observar que los sueros de los peces inmunizados reaccionaban con proteínas con peso molecular entre 20 kDa y 100 kDa (**Figura 10**). En el caso de los ECP, se detectaron dos grandes bandas reactivas en torno a 55 kDa y cinco bandas menos reactivas entre 20 y 100 kDa. En cambio, en el Western blot de OMP se pudo observar una banda muy reactiva por encima de 20 kDa, una menos reactiva por debajo de los 20 kDa y seis bandas menos intensas entre 20 y 100 kDa.

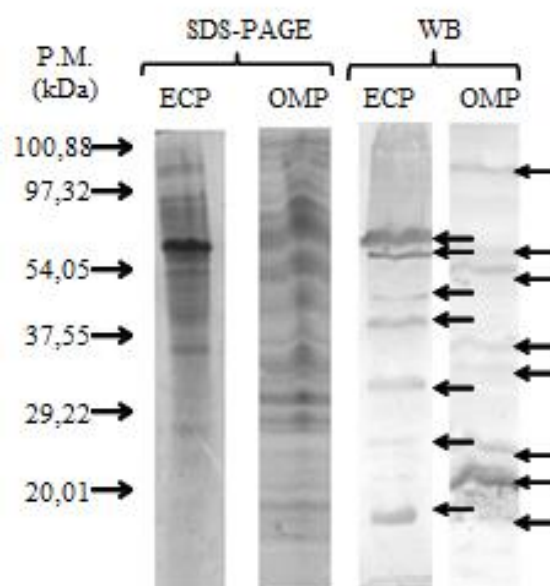


Figura 10. Electroforesis (izquierda) de las fracciones de ECP y OMP de *P. damsela* subsp *piscicida* Lg41.01 y *Western blot* (derecha) mostrando las proteínas reactivas frente a suero de peces inmunizados con antígenos de *P. damsela* subsp *piscicida* Lg41.01.

1.1.3. Identificación de proteínas inmunorreactivas frente a los sueros de peces inmunizados

El *Western blot* a partir de la electroforesis bidimensional de los ECP mostró dos manchas proteicas, correspondientes a proteínas reactivas frente a los sueros de los peces inmunizados con la bacterina, con un peso cercano a 50 kDa (**Figura 11**). En el caso de los OMP se encontraron 3 proteínas altamente reactivas entre 50 kDa a 20 kDa (**Figura 11**). No se detectó ninguna mancha de proteína reactiva en los ensayos de *Western blot* cuando los ECP y los OMP se enfrentaron a sueros de peces controles no inmunizados.

El procesamiento de las manchas de interés, y la posterior búsqueda en la base de datos Mascot, identificó algunas proteínas con un *Mascot Score* superior a 75, con una identificación significativa ($p < 0,05$) y con un intervalo de confianza superior al 99,7 % (**Tabla 21**). Según los resultados obtenidos en la base de datos respecto a los ECPs; la mancha ECP-1 fue homóloga a una metaloproteasa dependiente de ATP aislada en *Serratia proteamaculans*. La mancha proteica ECP-2 mostró homología con una proteína que confiere resistencia a telurito, aislada en *Bacillus cereus*. Respecto a las OMP, la mancha OMP-1 fue homóloga a una proteína Nrfa, una citocromo c nitrito

reductasa de *Wolinella succinogenes*; la mancha OMP-2 fue homóloga a una proteína antioxidante AhpC/Tsa de *Colwellia psychrerythraea* mientras que la mancha OMP-3 de OMP fue homóloga a una proteína de *Shewanella loihica* con dominio de unión a ADN relacionada con el choque térmico.

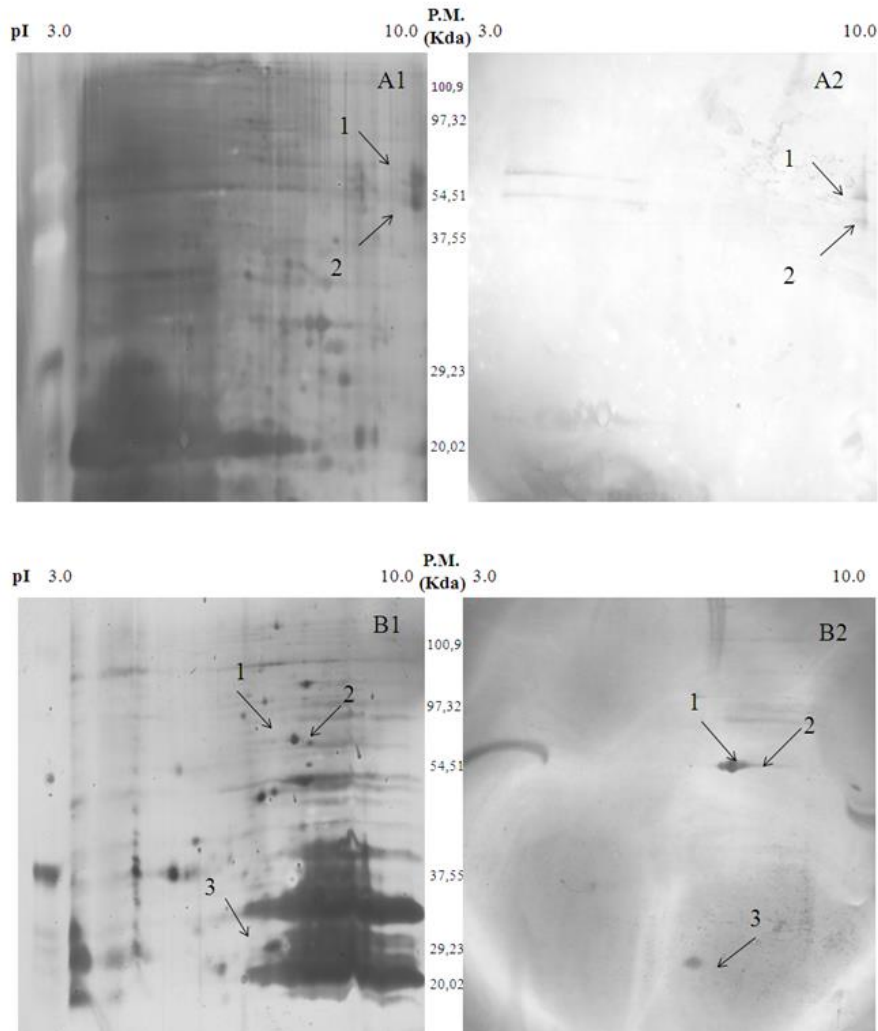


Figura 11. Geles 2D-PAGE (izquierda) y membranas de *Western blot* (derecha) de proteínas de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01. (A1) manchas proteicas de ECP en geles 2D-PAGE; (A2) manchas proteicas de ECP en membrana de *Western blot* enfrentadas con suero de *S. senegalensis* inmunizados frente *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01; (B1) manchas proteicas de OMP en geles 2D-PAGE; (B2) manchas proteicas de OMP en membrana de *Western blot* enfrentadas con suero de *S. senegalensis* inmunizados frente *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01. ECP-1: Metaloproteasa dependiente de ATP; ECP-2: Proteína de resistencia a telurito; OMP-1: nitrito reductasa; OMP-2: Antioxidante de la familia Ahp/CTSA; OMP-3: Proteína relacionada con el choque térmico.

Tabla 21. Identificación de las proteínas más inmunorreactivas de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 frente a sueros de lenguados inmunizados frente al patógeno. *Mascot score* >75.

Muestra	Proteína	Especies	Peso molecular (kDa)	P.I.	Grado de confianza (%)	Número de acceso
ECP-1	Metaloproteasa dependiente de ATP	<i>Serratia proteamaculans</i>	70,58	5,95	99,77	gi 157368730
ECP-2	Resistencia a telurito	<i>Bacillus cereus</i>	41,66	5,37	99,88	gi 187924238
OMP-1	Cadena A, Nrfa Y218f (nitrito reductasa)	<i>Wolinella succinogenes</i>	55,77	7,56	99,99	gi 168988896
OMP-2	Antioxidante de la familia AhpC/Tsa	<i>Colwellia psychrerythraea,</i>	22,15	4,69	100	gi 71282444
OMP-3	Proteína con dominio de unión a ADN relacionada con el choque térmico	<i>Shewanella loihica</i>	74,33	5,09	100	gi 127512097

1.2. Obtención de anticuerpos frente a *V. harveyi* e identificación de sus proteínas más inmunorreactivas

1.2.1. Titulación de anticuerpos en los lenguados inmunizados

En la primera inoculación con bacterina y ECP de *V. harveyi* Lg16.00, los peces inmunizados mostraron un aumento significativo en el título de anticuerpos frente los peces controles ($p < 0,05$) tanto frente a la bacterina (**Figura 12**) (dilución límite de 1/32.000), como frente a los ECP (**Figura 13**) (dilución límite de 1/4.000), en comparación con los resultados obtenidos para los peces control. En peces inoculados una segunda vez con bacterina y ECP, se obtuvo un título de anticuerpos significativo ($p < 0,05$) respecto a los controles frente a la bacterina (dilución límite de 1/64.000; **Figura 12**) y frente a los ECP (dilución límite de 1/4.000) (**Figura 13**).

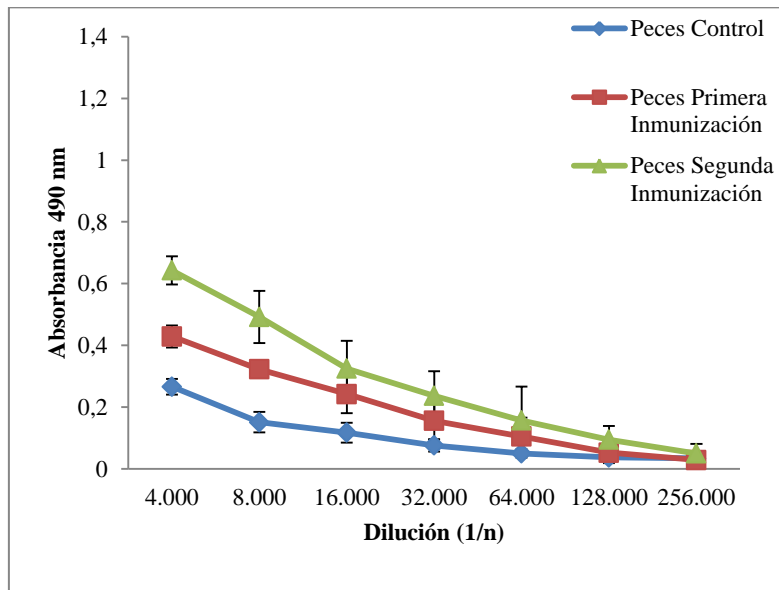


Figura 12. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA con distintas diluciones de los sueros de peces inmunizados, una y dos veces, con bacterina y ECP de *V. harveyi* Lg16.00, y peces controles. Para los ELISA se utilizó **bacterina** de *V. harveyi* Lg16.00 como antígeno.

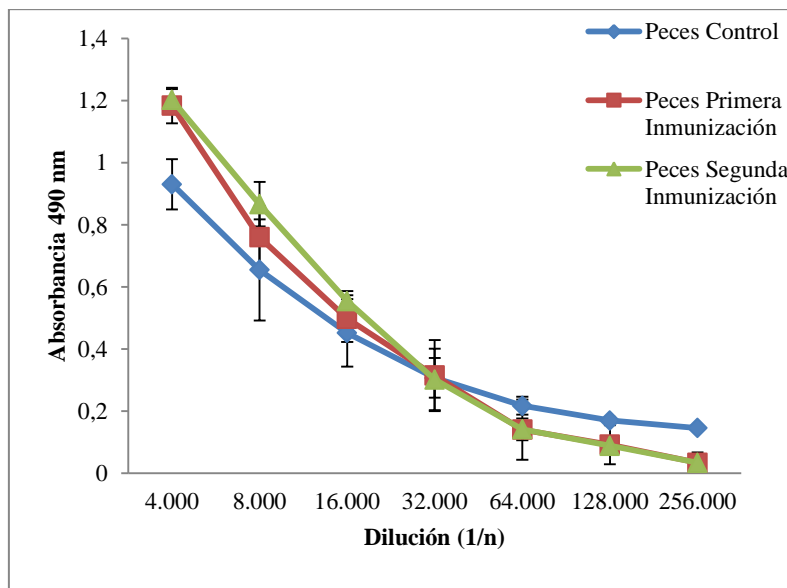


Figura 13. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA con distintas diluciones de los sueros de peces inmunizados, una y dos veces, con bacterina y ECP de *V. harveyi* Lg16.00, y peces controles. Para los ELISA se utilizó **ECP** de *V. harveyi* Lg16.00 como antígeno.

1.2.2. Detección de proteínas inmunorreactivas mediante electroforesis y Western blot

El perfil electroforético de los ECP y OMP de *V. harveyi* Lg16.00, mostró proteínas dentro de un amplio rango de peso molecular, entre menos de 20 kDa hasta 97 kDa (**Figura 14**). De estas, las bandas en torno a 37 kDa de ECP y OMP produjeron una alta reacción con los sueros de los peces inmunizados frente *V. harveyi* Lg16.00 (**Figura 14**).

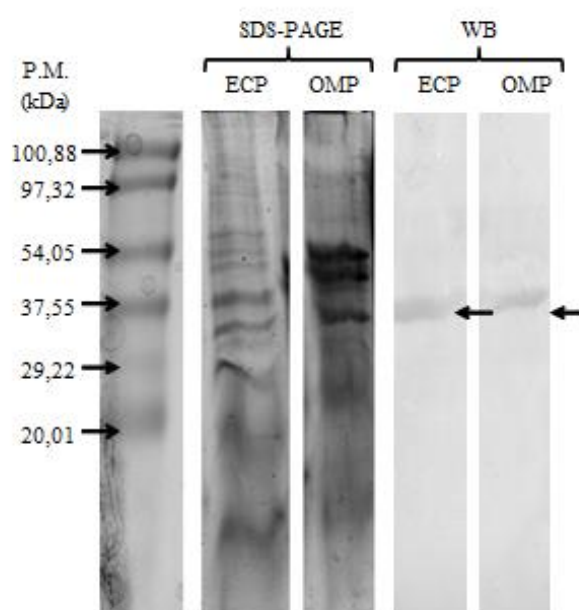


Figura 14. Electroforesis (imagen izquierda) de las fracciones de ECP y OMP de *V. harveyi* Lg16.00 y Western blot (imagen derecha) mostrando las proteínas reactivas frente a sueros de lenguados inmunizados con antígenos de *V. harveyi* Lg16.00.

1.2.3 Identificación de proteínas reactivas frente a los sueros de peces inmunizados

Cuando se realizó el *Western blot* a partir de un gel obtenido tras la electroforesis 2D con los ECP, se detectaron 5 proteínas entre 30 kDa y 70 kDa altamente inmunorreactivas, mientras que fueron dos las OMP con un peso próximo a 30 kDa altamente inmunorreactivas (**Figura 15**). Según los resultados obtenidos tras secuenciar las manchas proteicas en la base de datos Mascot (**Tabla 22**), la mancha de ECP-1 coincidió con una maltoporina de *Vibrio harveyi*. La mancha ECP-2 es

homóloga a una fosfohidrolasa dependiente de metal de *Vibrio orientalis*. Las manchas ECP-3 y ECP-4, fueron homólogas a porinas de la membrana externa de *V. harveyi*. Por último, la mancha ECP-5 coincidió con a una proteína de división celular FtsH de *Photobacterium profundum*.

Respecto a las OMP inmunoreactivas, la OMP-1 coincidió con la proteína 3-hidroxi-isobutirato deshidrogenasa de *V. harveyi* en tanto que la OMP-2 fue identificada como una fosfatasa ácida de *V. harveyi*.

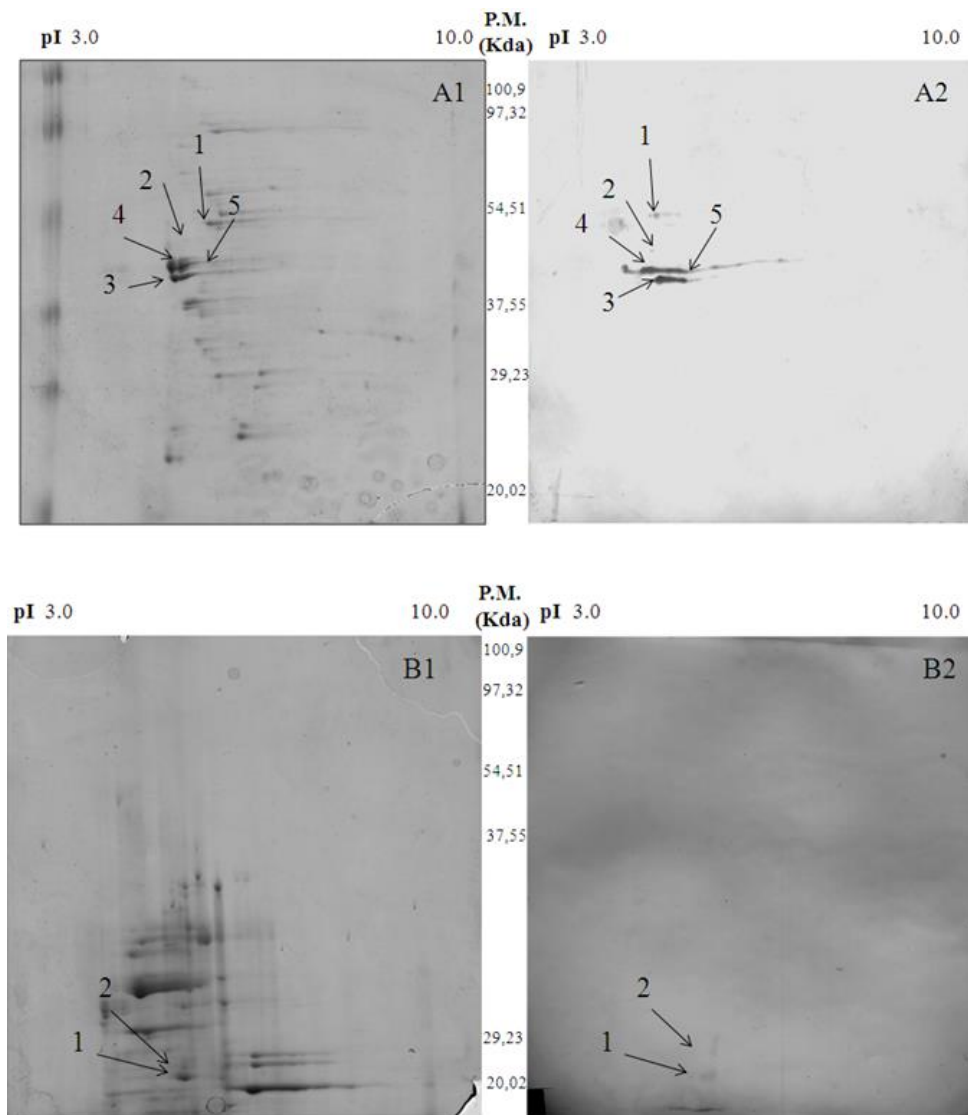


Figura 15. Geles 2D-PAGE (izquierda) y membranas de *Western blot* (derecha) de proteínas de *V. harveyi* Lg16.00. (A1) manchas proteicas de ECP en geles 2D-PAGE; (A2) manchas proteicas de ECP en membrana de *Western blot* reactivas frente a sueros de *S. senegalensis* inmunizados frente *V.harveyi* Lg16.00. (B1) manchas proteicas de OMP en geles 2D-PAGE; (B2) manchas proteicas de OMP en membrana de *Western blot* reactivas frente a sueros de *S. senegalensis* inmunizados frente *V.harveyi* Lg16.00. ECP-1: Maltoporina; ECP-2: Fosfohidrolasa; ECP-3 y ECP-4: porinas; ECP5: Proteína de division celular FtsH; OMP-1: 3-hidroxi-isobutirato deshidrogenasa; OMP-2: Fosfatasa ácida.

Tabla 22. Identificación de las proteínas más inmunorreactivas de *V. harveyi* Lg16.00 frente a sueros de lenguados inmunizados. *Mascot score* >75.

Muestra	Proteína	Especies	Peso molecular (kDa)	pI	Grado de confianza (%)	Número de acceso
ECP 1	Maltoporina	<i>Vibrio harveyi</i>	49,60	4,40	100	gi 156976051
ECP 2	Fosfohidrolasa	<i>Vibrio orientalis</i>	30,40	5,54	98,86	gi 261250101
ECP 3	Porina	<i>Vibrio harveyi</i>	34,64	4,16	100	gi 237846491
ECP 4	Porina	<i>Vibrio harveyi</i>	34,64	4,16	100	gi 237846491
ECP 5	Proteína de división celular FtsH	<i>Photobacterium profundum</i>	76,89	5,14	80,12	gi 54307809
OMP 1	Proteína 3-hidroxi-isobutirato deshidrogenasa	<i>Vibrio harveyi</i>	23,64	5,48	100	gi 269964136
OMP 2	Fosfatasa ácida	<i>Vibrio harveyi</i>	37,18	5,35	100	gi 153833305

2. Selección y caracterización de probióticos potenciales con similitud antigénica y capacidad antagónica frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.00 y *V. harveyi* Lg16.00

2.1. Selección de bacterias con antígenos comunes

La selección de bacterias con antígenos comunes a los patógenos de estudio, se realizó mediante la técnica *dot blot*. En este ensayo se enfrentaron las distintas cepas bacterianas a los sueros de lenguados inmunizados frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00. El grado de reacción colorimétrica en la membrana se consideró proporcional a la similitud antigénica de cada una de las cepas (**Figura 16**).

De las 718 cepas ensayadas se seleccionaron 138 cepas, atendiendo al criterio de tener al menos un 75 % de similitud respecto a las cepas patógenas tras el análisis de imagen de *dot blot*. En concreto se hallaron 40 cepas que mostraron una similitud superior al 75 % frente *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01, 98 cepas a *V. harveyi* Lg16.00, mientras que 6 de estas cepas mostraron una similitud antigénica superior al 75 % tanto frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 como a *V. harveyi* Lg16.00 (**Figura 17**).

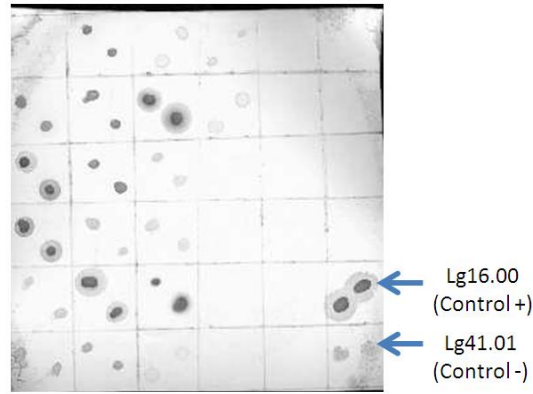


Figura 16. Ejemplo de membrana incubada con sueros de lenguados inmunizados frente a *V. harveyi* Lg16.00. En la membrana se añadió un control positivo (*V. harveyi* Lg16.00) y un control negativo (*P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01). En cada área se dispusieron dos inóculos de los antígenos ensayados.

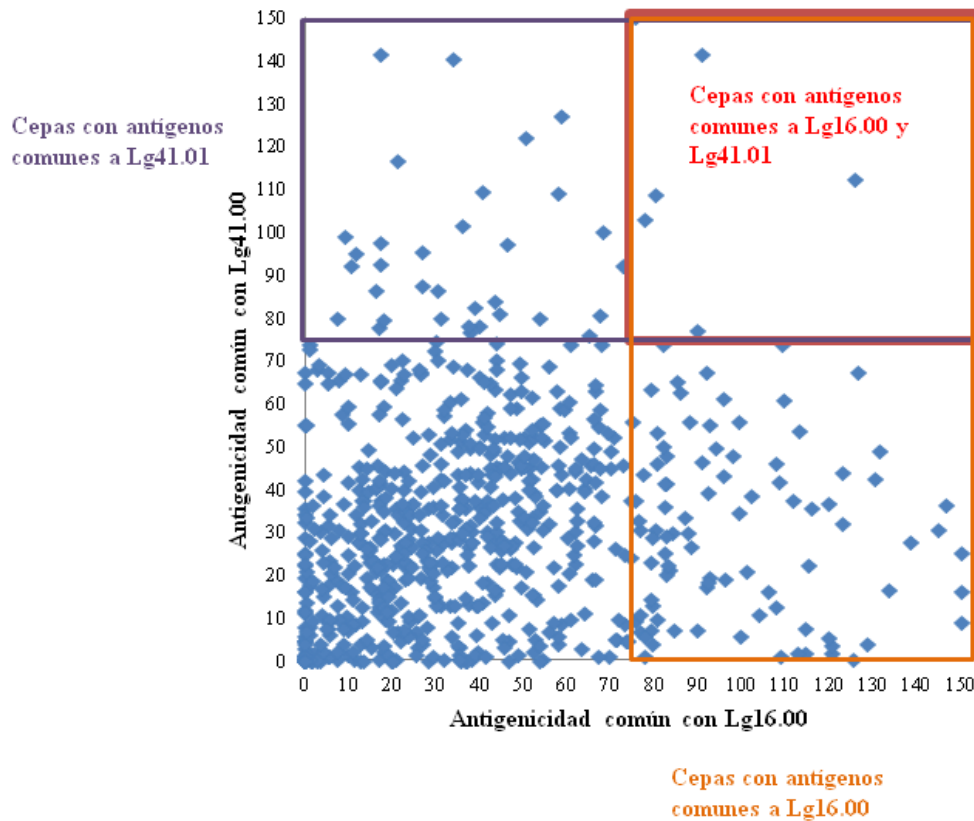


Figura 17. Porcentaje de semejanza antigénica de las cepas respecto a *V. harveyi* Lg16.00 (eje “x”) y *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01 (eje “y”). Cada punto representa una cepa. El porcentaje (%) de similitud antigénica se obtuvo mediante análisis de imagen de *dot blot* y procesadas con el programa *Quantity One* (Biorad). Entre los cuadros están comprendidas aquellas cepas que presentaron una intensidad de señal mayor al 75 % respecto los controles positivos.

2.2. Estudio de la capacidad antagonista de las cepas seleccionadas sobre el crecimiento de *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*

Se seleccionaron 138 cepas, respecto a las 718 cepas iniciales, que presentaron una similitud antigénica igual o superior al 75 %, respecto a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 o frente *V. harveyi* Lg16.00.

En los ensayos de inhibición se detectaron en total 12 cepas con capacidad antagonista, 7 de ellas inhibieron el crecimiento de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01, otras 7 cepas inhibieron a *V. harveyi* Lg16.00, mientras que las cepas DCF12.2 y DCF12.9 inhibieron tanto a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 como a *V. harveyi* Lg16.00 (**Tabla 23**).

Tabla 23. Media de los diámetros de los halos de inhibición producidos por las 12 cepas que mostraron capacidad antagónica frente *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00.

Cepas	Diámetro del halo de inhibición frente a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> Lg41.01(mm)	Diámetro del halo de inhibición frente a <i>V. harveyi</i> Lg16.00 (mm)
DCF12.2	6	11
DCF12.9	9	10
DCF12.10	4	0
DCF18.3	0	1
PLSW5	9	0
UMA5	5	0
UMA7	2	0
5-10-11	0	8
23-5-11	0	8
9ACE	0	7
27ACE	4	0
11PINO	0	5

Para los exámenes posteriores se descartó la cepa **DCF18.3** debido a su escaso poder antagónico frente a estas dos cepas patógenas.

2.3. Selección de cepas con proteínas antigénicamente similares a *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*

Tras la selección de bacterias en base a su capacidad antagónica para con *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00, se analizó la similitud antigénica de sus OMP con las de las dos cepas patógenas.

Usando sueros de peces inmunizados frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01, se detectaron tres bandas reactivas en la cepa **PLSW5**, dos bandas en el caso de las cepas **DCF12.2** y **DCF12.10**, y una banda en la cepa **DCF12.9**. Todas las bandas estaban comprendidas entre los 35 y 50 kDa (**Figura 18**).

Por otro lado, en el *Western blot* enfrentado a suero de lenguado inmunizado frente *V. harveyi* Lg16.00 se detectaron tres bandas muy reactivas en la cepa **5-10-11** y dos bandas en el caso de las cepas **DCF12.2** y **DCF12.9**. Estas bandas estaban comprendidas entre los 35 y 50 kDa (**Figura 19**).

Las demás cepas no mostraron proteínas comunes con las cepas patógenas ensayadas o su reacción fue muy débil.

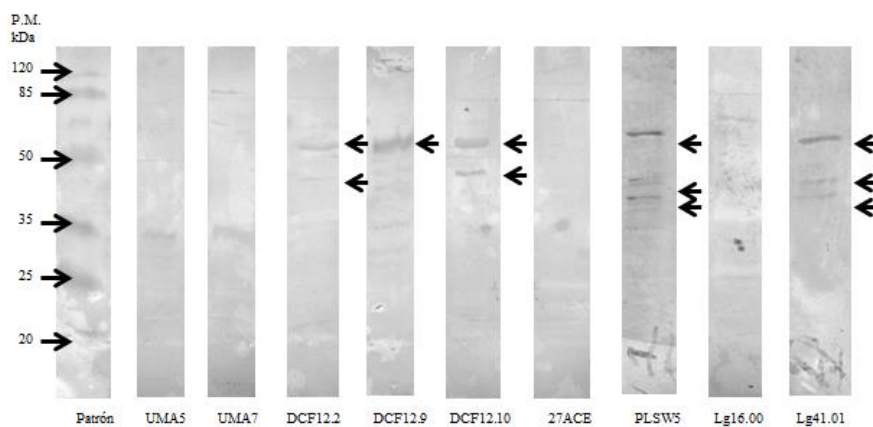


Figura 18. *Western blot* de proteínas de membrana externa de cepas antagónicas respecto a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01, enfrentadas con suero de lenguados inmunizados frente a esta cepa. *V. harveyi* Lg16.00 se utilizó como control negativo.

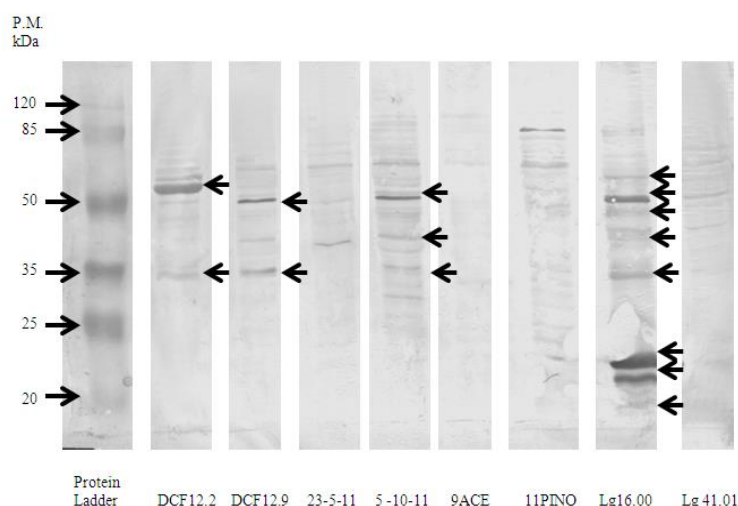


Figura 19. Western blot de proteínas de membrana externa de cepas antagónicas respecto a *V. harveyi* Lg16.00, enfrentadas con suero de lenguados inmunizados frente a esta cepa patógena. *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 se utilizó como control negativo.

Posteriormente, se seleccionaron aquellas cepas que presentaron al menos una banda proteica reactiva coincidente con alguna de las cepas patógenas.

2.4. Identificación de las cepas potencialmente probióticas

La identificación de las cepas se realizó mediante la comparación de la secuencia del gen ARN 16S con la base de datos del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI). Todas las cepas secuenciadas se identificaron con una homología del 99 % como pertenecientes al género *Vibrio* (Tabla 24), relacionándose la cepa **5-10-11** con *Vibrio* sp., la cepa **DCF12.2** con una cepa de *Vibrio proteolyticus*, mientras que las cepas **DCF12.9**, **DCF12.10** y **PLSW5** mostraron homología con diferentes cepas de *Vibrio alginolyticus*.

Tabla 24. Cepas identificadas con referencia de acceso a la base de datos NCBI.

Cepas	Especie	Similitud (%)	Número de acceso
5-10-11	<i>Vibrio</i> sp	100	KU667081.1
DCF12.2	<i>Vibrio proteolyticus</i>	99	KP640643.1
DCF12.9	<i>Vibrio alginolyticus</i>	100	KY229850.1
DCF12.10	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99	KX108994.1
PLSW5	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99	KR347232.1

2.5. Determinación de la inocuidad de las cepas seleccionadas y su capacidad para inducir la producción de anticuerpos en *Solea senegalensis*

La inoculación intraperitoneal de las 5 cepas seleccionadas a los lenguados no produjo mortalidad transcurridos 30 días. Tras ser sacrificados para la obtención de muestras, no se observaron anomalías en los órganos internos de los peces y tampoco no se detectaron las bacterias inoculadas en ninguno de sus órganos internos.

De los peces inoculados se obtuvo suero y se enfrentó tanto a las cepas ensayadas como a los patógenos estudiados para la determinación del título de anticuerpos. El título más elevado de anticuerpos específicos se encontró frente las cepas **DCF12.2** y **DCF12.10** (1/256.000) (**Tabla 26**), como también mostraron la mayor respuesta cruzada frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00. Por el contrario, la cepa **5-10-11** presentó la menor producción de anticuerpos (**Tabla 26**).

Después de transcurrir 30 días desde la primera inoculación, se volvieron a inocular intraperitonealmente los peces con cada una de las cepas y las mismas dosis ensayadas. Tampoco en este caso se observó mortalidad pasados 21 días desde la segunda inoculación. Igualmente tampoco se observaron afecciones en los órganos internos de los peces.

De estos peces también se obtuvo suero, observándose en general un aumento en el título de anticuerpos respecto a los peces inoculados una sola vez. En el caso de las bacterias **DCF12.2** y **DCF12.10**, también se incrementó la reacción cruzada frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00 (**Tabla 26**). Tras este ensayo, y debido a su menor capacidad de generación de anticuerpos, se descartó para posteriores ensayos la cepa **5-10-11** (**Tabla 25**).

Tabla 25. Resultados de ELISA obtenidos con sueros de peces inoculados una y dos veces con las cepas potencialmente probióticas. Los datos se expresan como dilución límite: máxima dilución de los sueros de peces inmunizados con valores superiores a la media de los sueros controles más el doble de su desviación típica. NT: no testado.

Cepas	ELISA realizado con las cepas inoculadas como antígeno		ELISA realizado con <i>P. damsela</i> e como antígeno		ELISA realizado con <i>V. harveyi</i> como antígeno	
	Primera inoculación	Segunda inoculación	Primera inoculación	Segunda inoculación	Primera inoculación	Segunda inoculación
5-10-11	1/1.000	1/1.000	<1/500	NT	<1/500	NT
DCF 12.2	1/256.000	1/256.000	1/2.000	1/8.000	1/16.000	1/64.000
DCF 12.9	1/4.000	1/32.000	1/2.000	1/4.000	1/2.000	1/1.000
DCF 12.10	1/256.000	1/256.000	1/4.000	1/4.000	1/8.000	1/16.000
PLSW5	1/64.000	1/256.000	1/2000	1/16.000	1/4.000	1/2.000

2.6. Detección de las proteínas de las cepas seleccionadas que generan reacción cruzada con las cepas patógenas

Mediante los ensayos de electroforesis 2D y *Western blot*, se detectaron proteínas inmunogénicas frente a sueros de las cepas patógenas en las cepas **DCF12.2**, **DCF12.9**, **DCF12.10** y **PLSW5** (Figuras 20-25). Se seleccionaron aquellas manchas proteicas con mayor inmunorreacción y se identificaron mediante espectrometría de masas (Tablas 26 y 27). En el caso de los ensayos, con los sueros controles no se observaron proteínas reactivas.

En el *Western blot* en el que se usó suero de peces inmunizados frente a *P. damsela*e subsp. *piscicida* Lg41.01, la OMP de la cepa **DCF12.2** que generó mayor reacción (Figura 20) se identificó con un 100% de confianza como una proteína sin caracterizar de *Vibrio* sp. (mancha 1) (Tabla 27). Por otro lado, la proteína más reactiva de la cepa **DCF12.9** (Figura 21) se identificó con un 100 % de confianza como una proteína transportadora de maltosas de *Vibrio alginolyticus* (mancha 1). La proteína más inmunorreactiva de la cepa **DCF12.10** (Figura 22) correspondió a una alanina deshidrogenasa de *Vibrio alginolyticus* (mancha 1). Finalmente para la cepa **PLSW5** (Figura 23), las proteínas más reactivas coincidieron con un grado de confianza del

Resultados

100 % con una proteína periplásmica del sistema transportador ABC de *Vibrio sp.* (mancha 1) y una fosfatasa periplásmica de *Vibrio alginolyticus* (mancha 2).

Cuando se enfrentaron los OMP de la cepa **DCF12.2** con antisuero frente a *V. harveyi* Lg16.00 (**Figura 24**), las proteínas más reactivas fueron una proteína transportadora ABC de *Vibrio vulnificus* (mancha 1), una proteína transportadora ABC de *Vibrio furnissii* (mancha 2), una permeasa del tipo A de *Vibrio fluvialis* (mancha 3), y un transportador de tipo TAXI de *Vibrio sp.* (mancha 4). Todas estas proteínas se identificaron en la base de datos con un 100 % de confianza.

Cuando se enfrentaron las OMP de la cepa **DCF12.9** con antisuero *V. harveyi* Lg16.00 (**Figura 25**), las proteínas con mayor señal se identificaron como una proteína transportadora ABC de *Vibrio alginolyticus* (mancha 1); una proteína transportadora de maltosas de *Vibrio alginolyticus* (mancha 2); proteína de membrana externa OmpA de *Vibrio alginolyticus* (mancha 3); y una proteína inmunogénica de *Vibrio alginolyticus* (mancha 4).

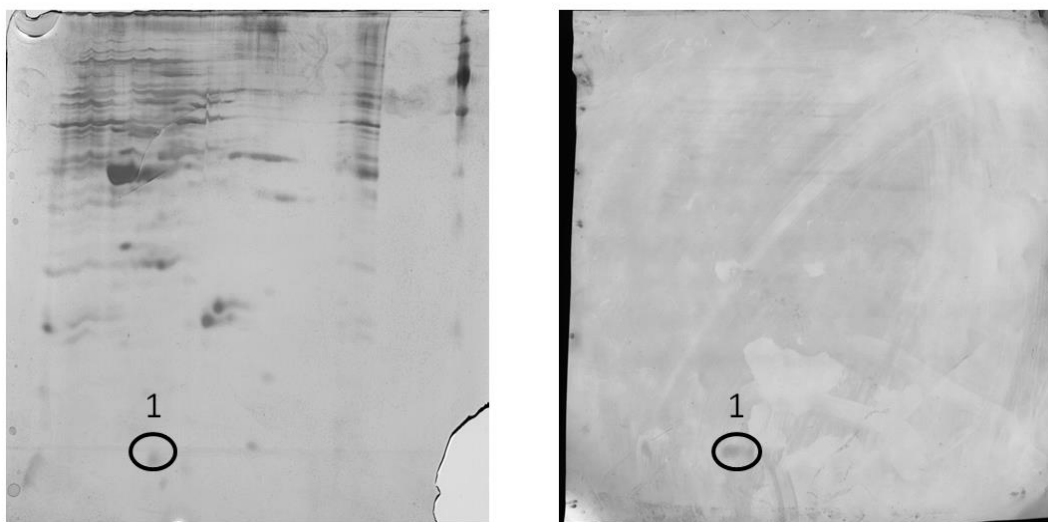


Figura 20. Electroforesis 2D de proteínas de la cepa **DCF12.2** (izquierda) y *Western blot* con sueros de lenguados inmunizados frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 (derecha). Los círculos indican aquellas proteínas que han dado mayor reacción en el *Western blot*.

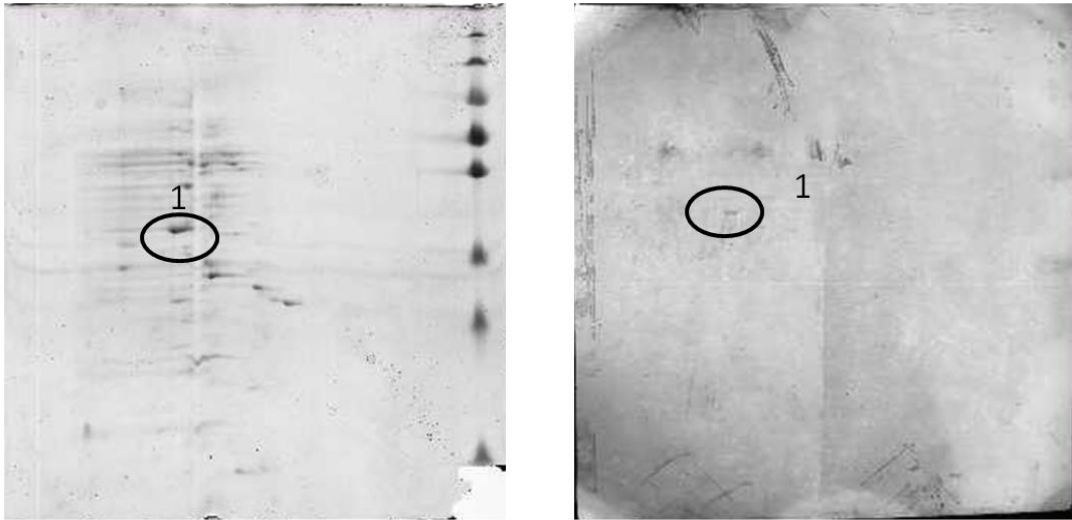


Figura 21. Electroforesis 2D de proteínas de la cepa **DCF12.9** (izquierda) y *Western blot* con sueros de lenguados inmunizados frente a *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01 (derecha). Los círculos indican aquellas proteínas que han dado mayor reacción en el *Western blot*.

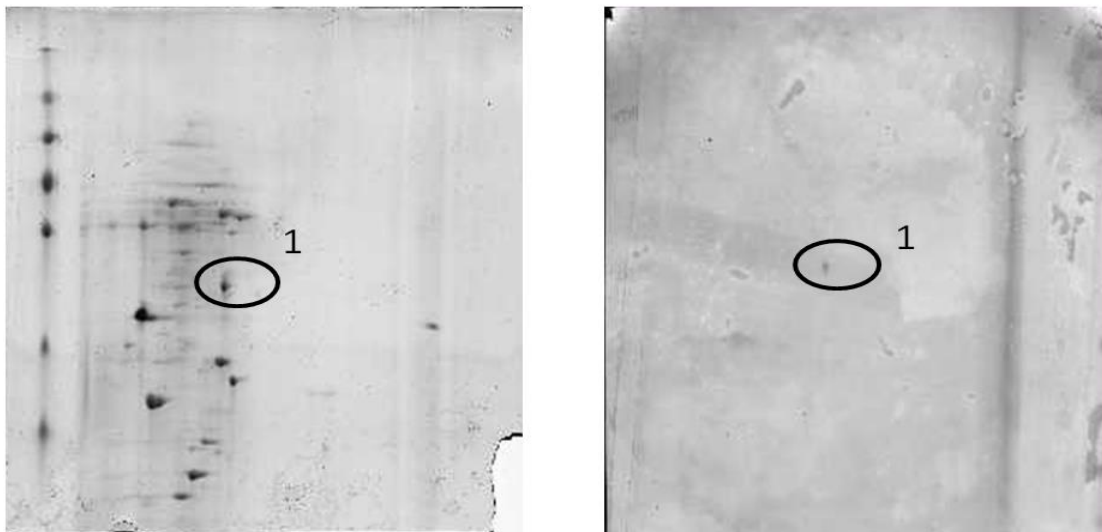


Figura 22. Electroforesis 2D de proteínas de la cepa **DCF12.10** (izquierda) y *Western blot* con sueros de lenguados inmunizados frente a *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01(derecha). Los círculos indican aquellas proteínas que han dado mayor reacción en el *Western blot*.

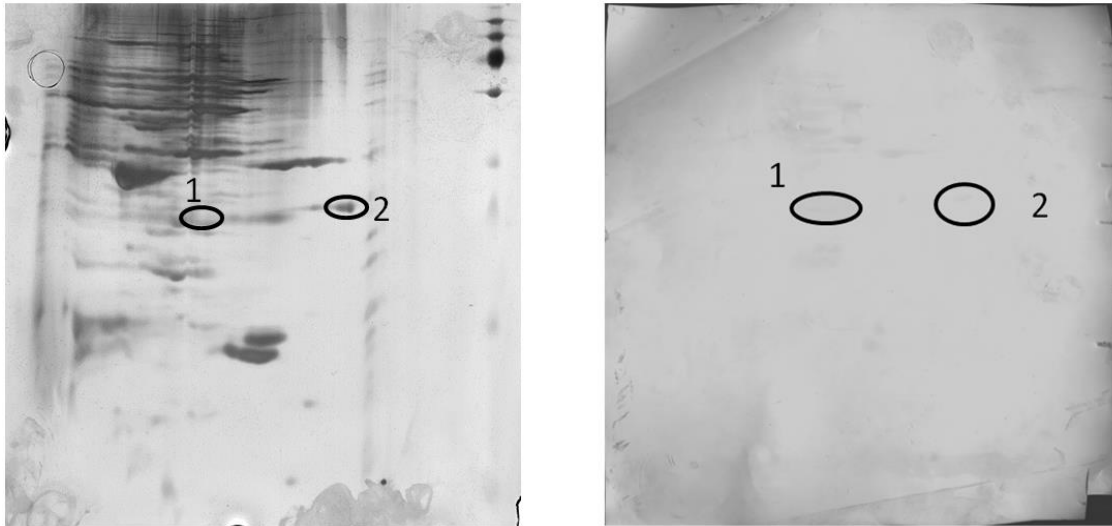


Figura 23. Electroforesis 2D de proteínas de la cepa **PLSW5** (izquierda) y *Western blot* con sueros de lenguados inmunizados frente a *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01 (derecha). Los círculos indican aquellas proteínas que han dado mayor reacción en el *Western blot*.

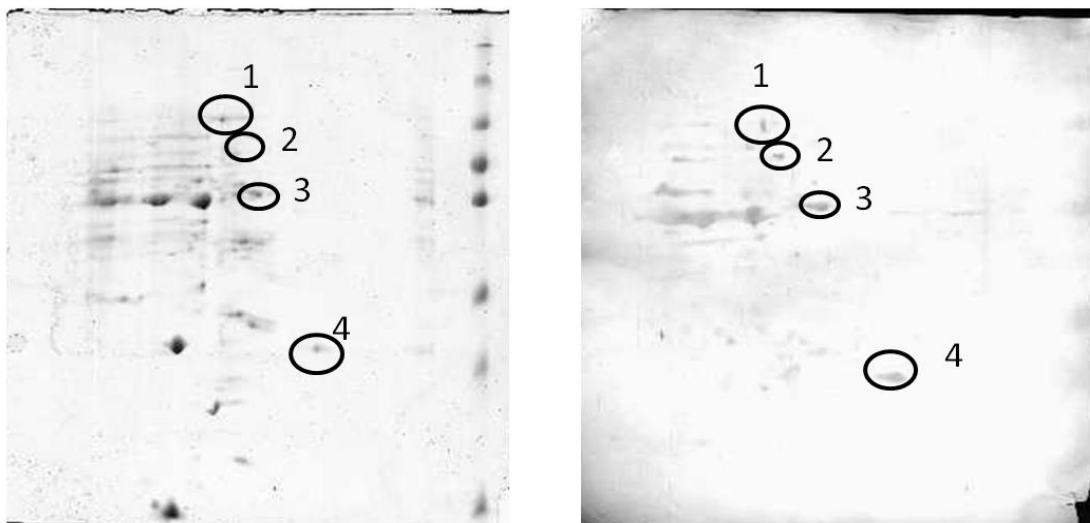


Figura 24. Electroforesis 2D de proteínas de la cepa **DCF12.2** (izquierda) y *Western blot* con sueros de lenguados inmunizados frente a *V. harveyi* Lg16.00 (derecha). Los círculos indican aquellas proteínas que ha dado mayor reacción en el *Western blot*.

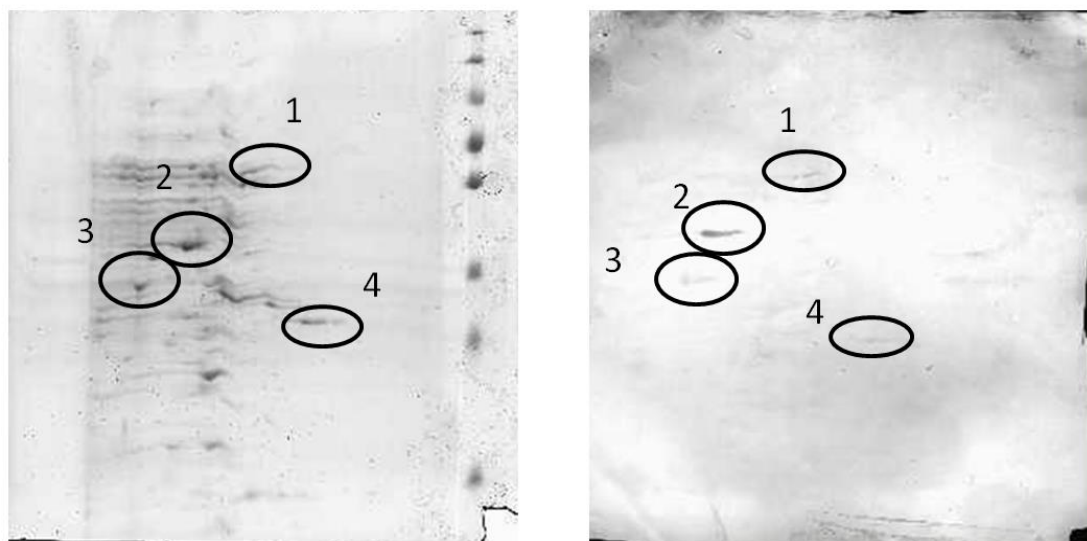


Figura 25. Electroforesis 2D de proteínas de la cepa **DCF12.9** (izquierda) y *Western blot* con sueros de lenguados inmunizados frente a *V. harveyi* Lg16.00 (derecha). Los círculos indican aquellas proteínas que han dado mayor reacción en el *Western blot*.

Tabla 26. Identificación de las proteínas más reactivas de las bacterias, DCF12.2, DCF12.9, DCF12.10 y PLSW5 frente a sueros de lenguados inmunizados frente *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01. Todas las identificaciones se realizaron con un grado de confianza del 100 %.

Cepas enfrentadas	Mancha proteica	Nombre de la proteína	Especie	Peso (kDa)	pI	Número de acceso
DCF12.2	1	Proteína sin caracterizar	<i>Vibrio sp.</i>	9,93	5,17	tr D0M7E6 D0M7E
DCF12.9	1	Proteína transportadora ABC de maltosas	<i>Vibrio alginolyticus</i>	42,13	4,84	gi 91223346
DCF12.10	1	Alanina deshidrogenasa	<i>Vibrio alginolyticus</i>	40,13	5,41	gi 91227573
PLSW5	1	Proteína transportadora ABC periplásmica transductora de señales	<i>Vibrio sp.</i>	28,56	5,34	tr A7K269 A7K26
	2	Fosfatasa periplásmica.	<i>Vibrio alginolyticus</i>	28,66	8,84	tr D0WUN9 D0WUN

Tabla 27. Identificación de las proteínas más inmunorreactivas de las bacterias DCF12.2 y DCF12.9 frente a sueros de lenguados inmunizados frente *V. harveyi* Lg16.00. Todas las identificaciones se realizaron con un grado de confianza del 100 %.

Cepas enfrentadas	Mancha proteica	Nombre de la proteína	Especie	Peso (kDa)	pI	Número de acceso
DCF12.2	1	Proteína transportadora ABC	<i>Vibrio vulnificus</i>	57,73	5,96	gi 27364509
	2	Proteína transportadora ABC	<i>Vibrio furnissii</i>	71,78	5,26	gi 260770658
	3	Permeasa tipo A	<i>Vibrio fluvialis</i>	61,02	5,78	gi 50844280
	4	Transportador TRAP de tipo TAXI	<i>Vibrio sp.</i>	34,8	8,18	gi 262392452
DCF12.9	1	Proteína transportadora ABC	<i>Vibrio alginolyticus</i>	57,54	5,71	gi 91224884
	2	Proteína transportadora de maltosas	<i>Vibrio alginolyticus</i>	42,13	4,84	gi 91223346
	3	OmpA	<i>Vibrio alginolyticus</i>	36,15	4,27	gi 189475074
	4	Proteína inmunogénica	<i>Vibrio alginolyticus</i>	34,88	7,63	gi 91228839

2.7. Estudios complementarios de las cepas seleccionadas como potencialmente probióticas

2.7.1. Determinación de la susceptibilidad de las cepas frente antibióticos

El antibiograma realizado a las cepas seleccionadas mostró que estas fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos estudiados. Las cepas **DCF12.9** y **PLSW5** mostraron resistencia a los antibióticos amoxicilina y ampicilina, mientras que las cepas **DCF12.2** y **DCF12.10** no presentaron ningún tipo de resistencia a los antibióticos ensayados (**Tabla 28**).

Tabla 28: Susceptibilidad de las cepas potencialmente probióticas a algunos antibióticos según el criterio CLSI. Entre paréntesis: diámetro del halo de inhibición (mm). S: sensible; I: intermedio; R: resistente.

Antibióticos (µg/disco)	DCF12.2	DCF12.9	DCF12.10	PLSW5	<i>E. coli</i> 25922
Ácido nalidíxico (30)	(40) S	(40) S	(36) S	(26) S	(22)
Amoxicilina (25)	(20) S	(0) R	(14) I	(0) R	(16)
Ampicilina (10)	(14) I	(0) R	(14) I	(0) R	(12)
Cloranfenicol (30)	(32) S	(40) S	(32) S	(34) S	(22)
Enrofloxacina (5)	(40) S	(30) S	(24) S	(24) S	(26)
Eritromicina (15)	(20) I	(24) S	(16) I	(20) I	(8)
Estreptomicina (25)	(22) S	(20) S	(16) S	(20) S	(14)
Gentamicina (10)	(22) S	(22) S	(18) S	(20) S	(16)
Oxitetraciclina (30)	(26) S	(30) S	(23) S	(24) S	(20)
Sulfametoxazol (25)	(32) S	(32) S	(24) S	(24) S	(22)
Tetraciclina (30)	(24) S	(40) S	(26) S	(26) S	(20)

2.7.2. Supervivencia en agua de mar

Se pudo observar que todas las cepas se mantuvieron viables en agua de mar a 22 °C durante 5 días, no existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) en el título de las cepas entre los valores a tiempo inicial y final (**Figura 26**)

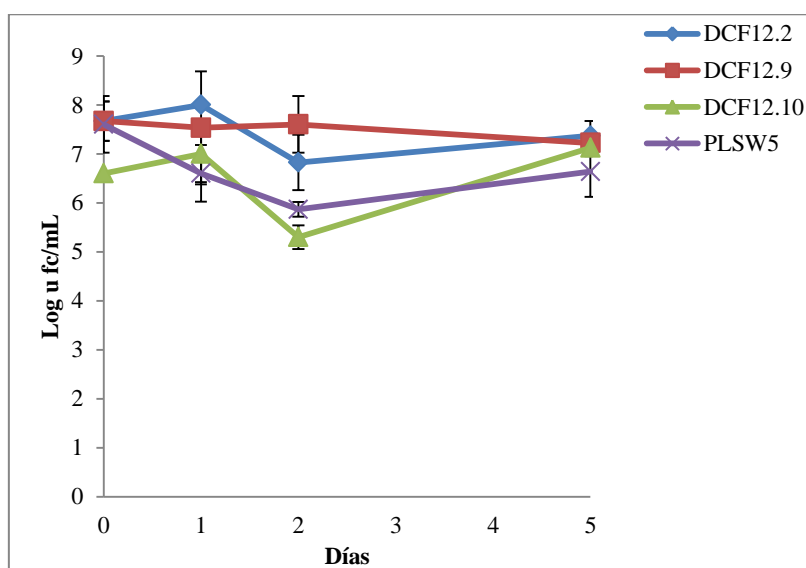


Figura 26. Supervivencia de las cepas potencialmente probióticas incubadas en agua de mar a 22 °C.

2.7.3. Supervivencia a 4 °C

Aunque todas las cepas se mantuvieron viables en solución salina a 4 °C (**Figura 27**), si se observó una disminución significativa de su título entre el inicio y el final del experimento ($p < 0,05$).

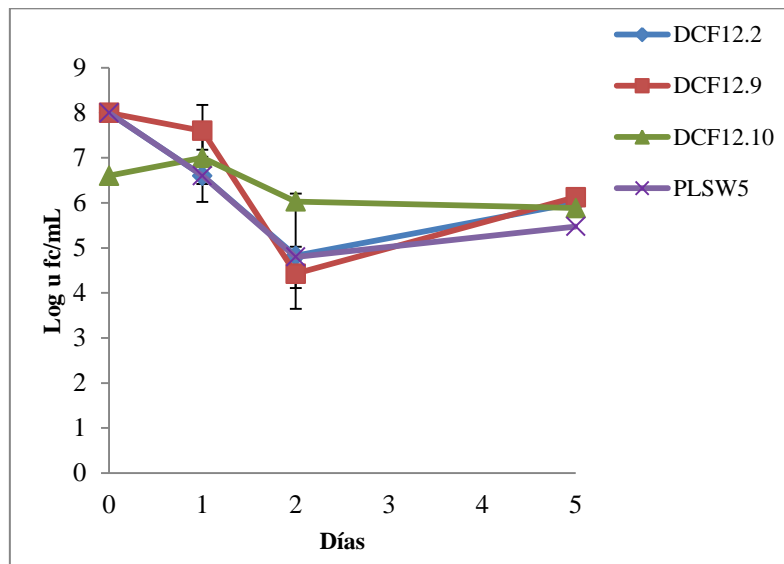


Figura 27. Supervivencia de las cepas potencialmente probióticas incubadas en solución salina a 4 °C.

2.7.4. Supervivencia a la liofilización

Todas las cepas seleccionadas se pudieron recuperar en los medios de cultivo tras el proceso de liofilización. No se observaron diferencias de supervivencia entre los distintos procedimientos aplicados para la conservación de las cepas.

2.7.5. Supervivencia en el pienso.

Todas las cepas sobrevivieron en el pienso y almacenadas a -20 °C, 4 °C y 22 °C, aunque en general mostraron una pérdida de viabilidad de varios órdenes de magnitud (**Figuras 28-31**).

Las cepas **DCF12.2** (**Figura 28**) y **DCF12.9** (**Figura 29**) sufrieron un descenso significativo ($p < 0,05$) en el número de bacterias viables en todos los tratamientos, independientemente del uso de alginato o de la temperatura de almacenamiento. En el caso de la cepa **DFC12.9** sí se pudo observar, a las 24 h de almacenamiento a 22 °C, una mayor supervivencia en las bacterias administradas con alginato que en solución salina. En el caso de la cepa **DCF12.10** (**Figura 30**) sí se observó una mayor viabilidad

de las cepas congeladas (independientemente del uso de alginato) comparada con el almacenamiento a 4 °C y 22 °C. Igualmente, en el caso de la cepa **PLSW5** (Figura 31) existió una menor mortalidad de las cepas congeladas respecto a las almacenadas a 4 °C y 22 °C, aunque en este caso el almacenamiento sin alginato dio mejor resultado de viabilidad que las muestra congeladas en alginato.

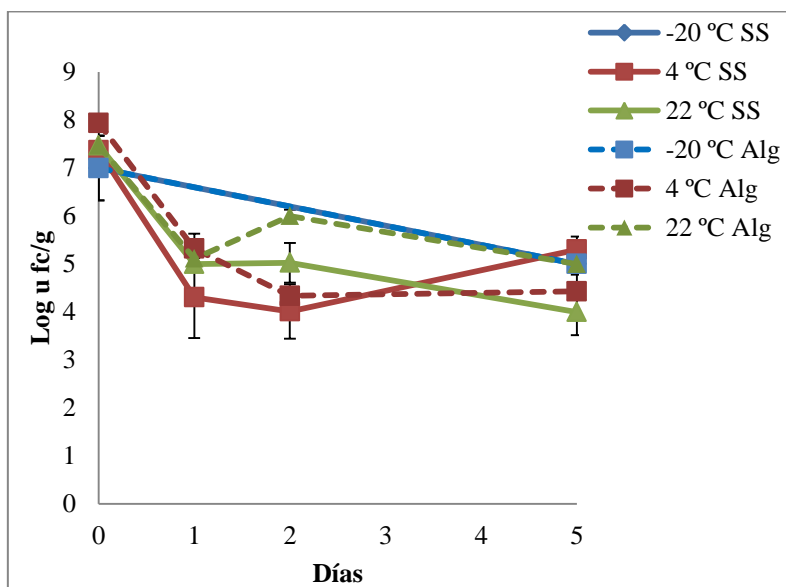


Figura 28. Supervivencia de la cepa **DCF12.2** administrada en el pienso con solución salina (SS) o con alginato (Alg), y almacenada a distintas temperaturas (-20 °C, 4 °C, y 22 °C). Valores expresados en log ufc/g de pienso.

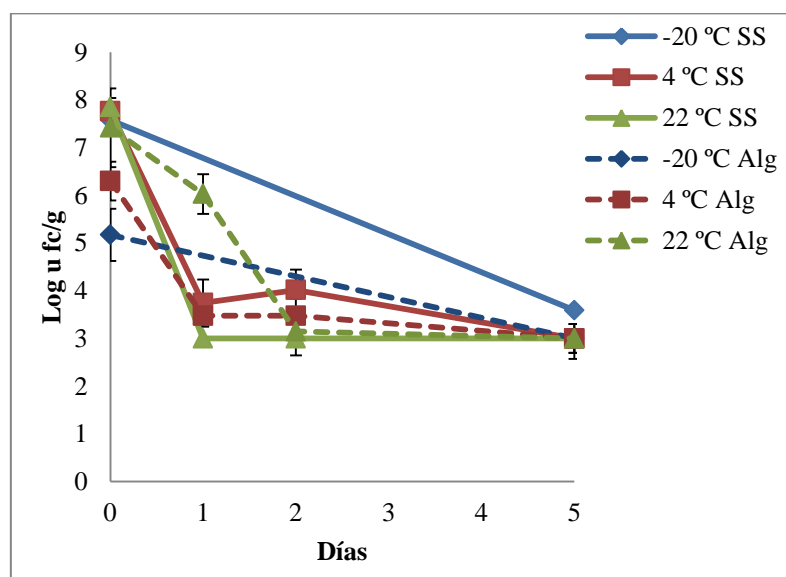


Figura 29. Supervivencia de la cepa **DCF12.9** en el pienso administrada con solución salina (SS) o con alginato (Alg), y almacenada a distintas temperaturas (-20 °C, 4 °C, y 22 °C). Valores expresados en log ufc/g de pienso.

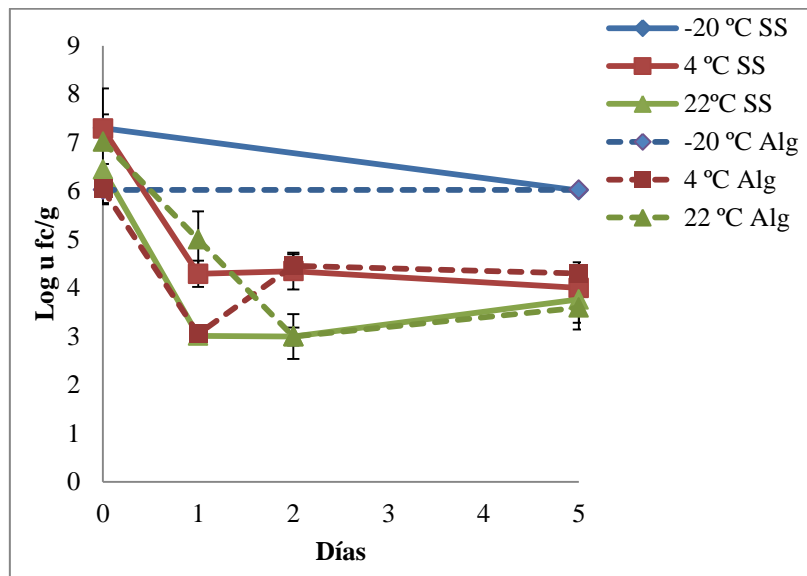


Figura 30. Supervivencia de la cepa **DCF12.10** en el pienso administrada con solución salina (SS) o con alginato (Alg), y almacenada a distintas temperaturas (-20 °C, 4 °C, y 22 °C). Valores expresados en log ufc/g de pienso.

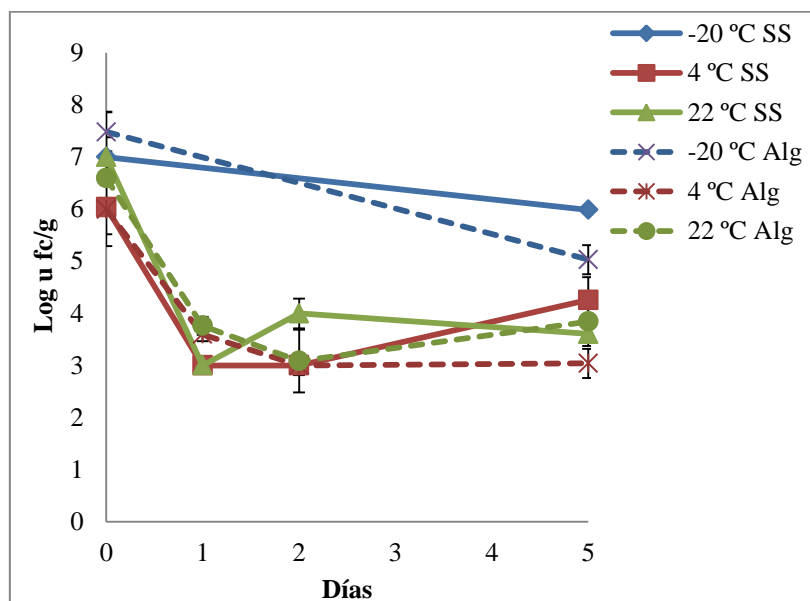


Figura 31. Supervivencia de la cepa **PLSW5** en el pienso administrada con solución salina (SS) o con alginato (Alg), y almacenada a distintas temperaturas (-20 °C, 4 °C, y 22 °C). Valores expresados en log ufc/g de pienso.

2.7.6. Determinación de las actividades enzimáticas

Todas las cepas presentaron las actividades lecitinasa, gelatinasa, caseinasa, amilasa y lipasa.

2.7.7. Evaluación del crecimiento en diferentes pH

Todas las cepas crecieron a las 24 h de incubación en los caldos nutritivos con un pH superior a 4, determinándose por la turbidez aparecida en el medio (**Tabla 29**).

Tabla 29. Crecimiento de cada una de las cepas en TSB salino a diferentes pH. El signo positivo indica turbidez (densidad óptica superior a 0,5 medida a 600 nm) en el medio debida al crecimiento bacteriano.

pH	DCF12.2	DCF12.9	DCF12.10	PLSW5
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+

2.7.8. Evaluación del desarrollo de la cepa *Vibrio proteolyticus* DCF12.2 en presencia de bilis y diferentes pH

Tras el estudio de las características de las cepas seleccionadas, se seleccionó la cepa **DCF12.2** para los futuros ensayos *in vivo* con lenguados, por lo que se realizaron ensayos *in vitro* de la posible viabilidad de esta cepa en el aparato digestivo de los peces.

La bacteria fue tolerante a todas las concentraciones de bilis ensayadas (**Figura 32**). Respecto al cultivo de la cepa a distintos pH y a diferentes tiempos, la cepa **DCF12.2** no toleró los medios con un pH igual o inferior a 4, inhibiéndose su crecimiento en menos de una hora a pH 2, en dos horas a pH 3 y en tres horas a pH 4, mientras que a pH de 5, 6 y 7 la cepa se mantuvo viable durante las tres horas de duración del experimento (**Figura 33**).

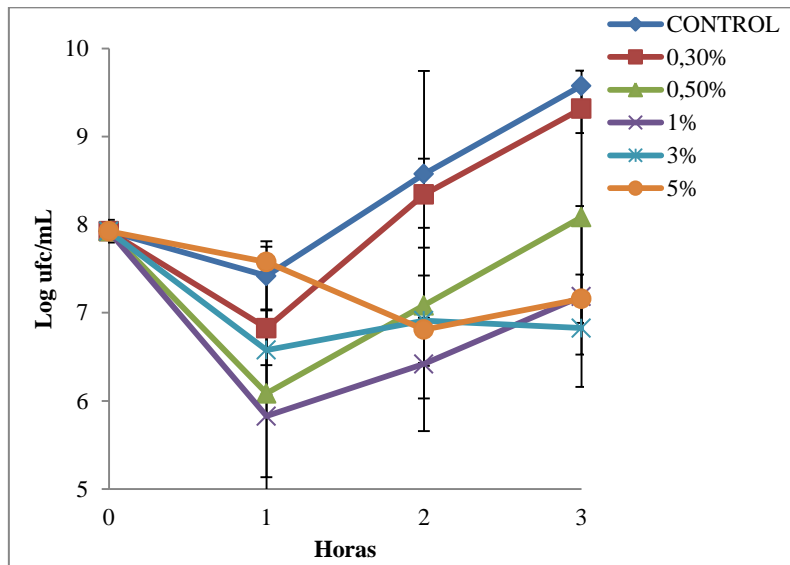


Figura 32. Viabilidad de la cepa DCF12.2 incubadas en TSB salino con diferentes concentraciones de sales biliares.

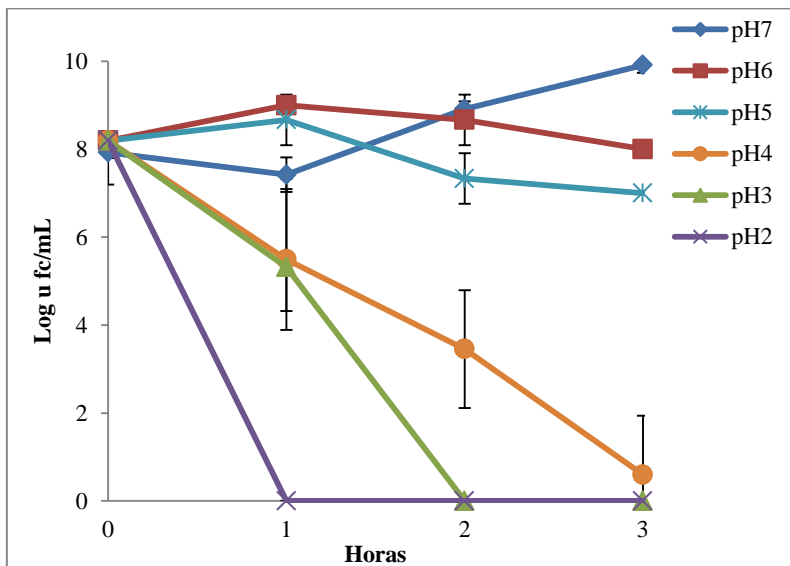


Figura 33. Viabilidad de la cepa DCF12.2 incubadas en TSB salino a diferentes pH.

3. Efecto de la cepa *Vibrio proteolyticus* DCF12.2 sobre el sistema inmunitario de lenguados y protección frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*

3.1. Detección de anticuerpos

Cuando se utilizó la *V. proteolyticus* DCF12.2 como antígeno en el ELISA, solo se observaron incrementos significativos de anticuerpos ($p < 0,05$) en el suero de los lenguados a los que se administró el potencial probiótico por vía intraperitoneal (**Figura 34**). No se obtuvieron diferencias significativas en el título de anticuerpos respecto a los controles cuando el microorganismo se administró por baño o en el pienso. Cuando se utilizaron los patógenos como antígenos en el ELISA, en el tratamiento intraperitoneal se observaron reacciones cruzadas frente *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 a día 56 (**Figura 35**) y frente a *V. harveyi* Lg16.00 los días 14 y 56 (**Figura 36**).

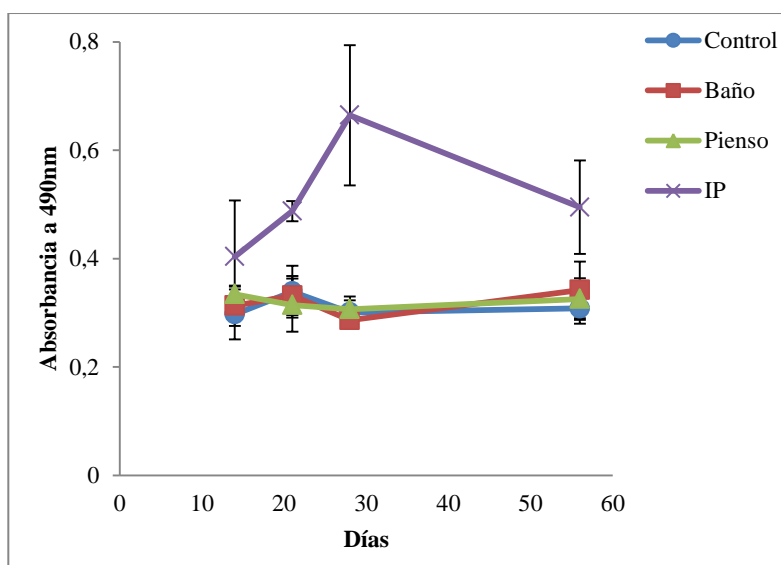


Figura 34. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA con sueros de peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2, por vía intraperitoneal (IP), por baño, o mediante el pienso. Para los ELISA se utilizó la bacteria DCF12.2 como antígeno y los sueros a una dilución 1/500.

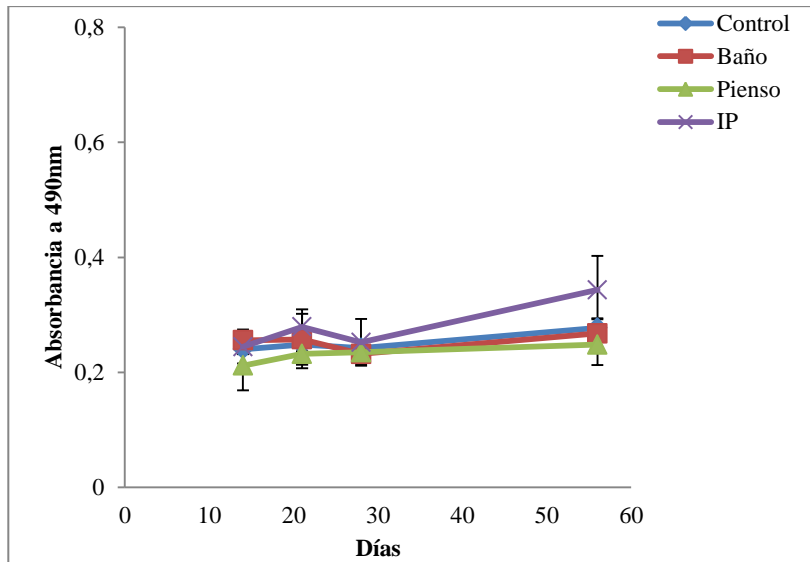


Figura 35. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA con sueros de peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2, por vía intraperitoneal (IP), por baño o mediante el pienso. Para los ELISA se utilizó *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 como antígeno y los sueros a una dilución 1/500.

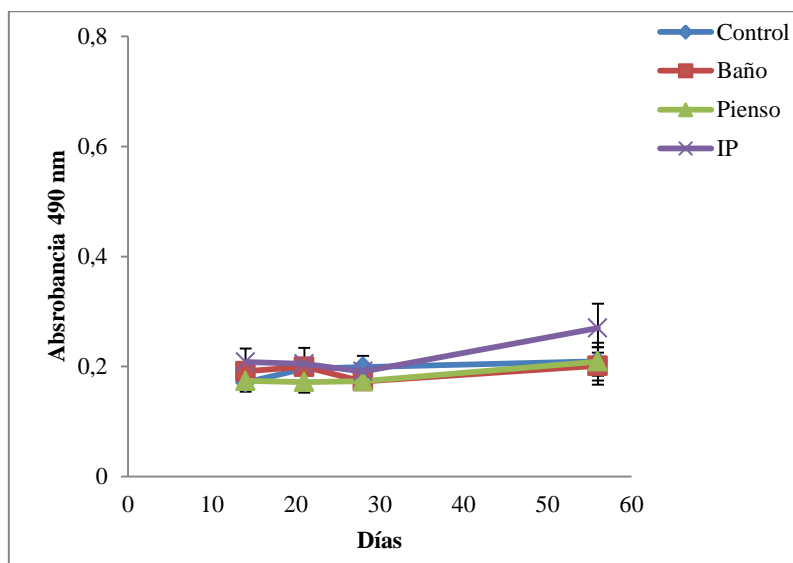


Figura 36. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA con sueros de peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2, por vía intraperitoneal (IP), por baño o mediante el pienso. Para los ELISA se utilizó *V. harveyi* Lg16.00 como antígeno y los sueros a una dilución 1/500.

En el mucus intestinal de los peces se detectó un aumento significativo de anticuerpos ($p < 0,05$) los días 7, 14 y 21, tanto frente al probiótico (Figura 37), como a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 (Figura 38) y a *V. harveyi* Lg16.00 (Figura 39) usados como antígenos en los ELISA. El nivel de anticuerpos en el tratamiento por vía intraperitoneal fue significativamente superior a los controles desde el día 7 hasta el día 56 en todos los casos (Figuras 37-39).

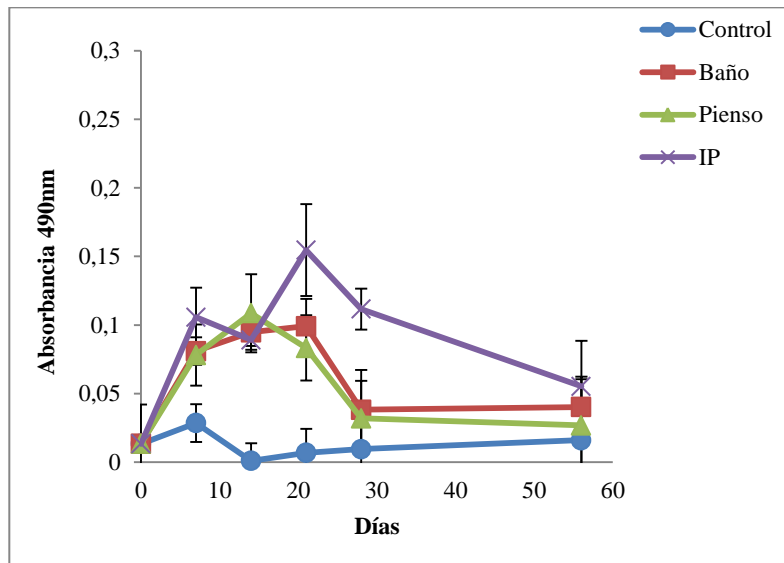


Figura 37. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA con el mucus intestinal de peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2 por vía intraperitoneal (IP), por baño o mediante el pienso. Para los ELISA se utilizó la bacteria DCF12.2 como antígeno.

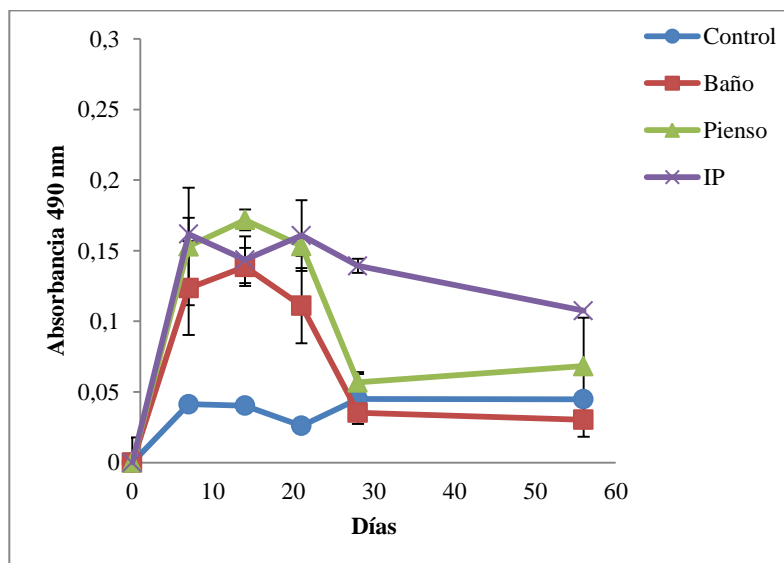


Figura 38. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA con el mucus intestinal de peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2 por vía intraperitoneal (IP), por baño o mediante el pienso. Para los ELISA se utilizó *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 como antígeno.

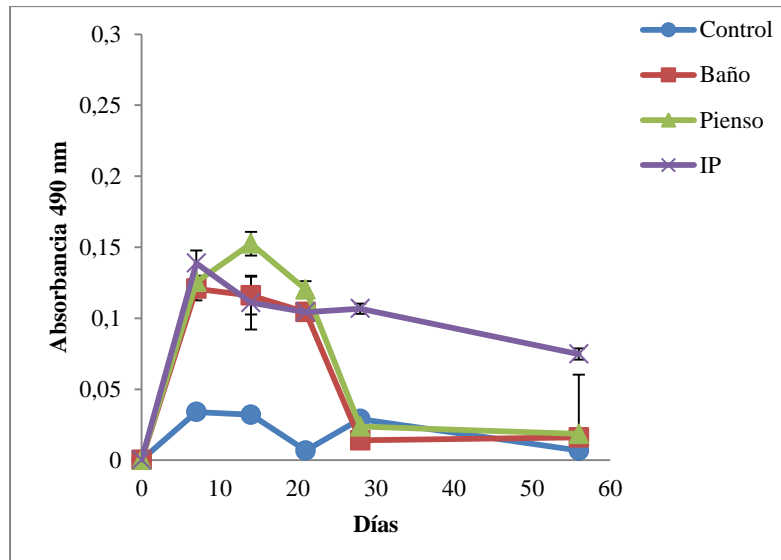


Figura 39. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA con el mucus intestinal de peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2 por vía intraperitoneal (IP), por baño o mediante el pienso. Para los ELISA se utilizó *V. harveyi* Lg16.00 como antígeno.

En el mucus de la piel se detectó un aumento significativo del título de anticuerpos ($p < 0,05$) a día 56 por vía intraperitoneal respecto el control. Estos resultados se obtuvieron tanto para *V. proteolyticus* DCF12.2 (**Figura 40**) como para *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 (**Figura 41**) cuando estas se utilizaron como antígenos en el ELISA. Asimismo, cuando se analizó el título de anticuerpos frente *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 (**Figura 41**), se observó un aumento significativo del título de anticuerpos a día 7 en el tratamiento por baño y mediante el pienso, y a día 56 mediante el pienso respecto el control.

No se detectaron diferencias significativas cuando se usó *V. harveyi* Lg16.00 como antígeno en el ELISA (**Figura 42**).

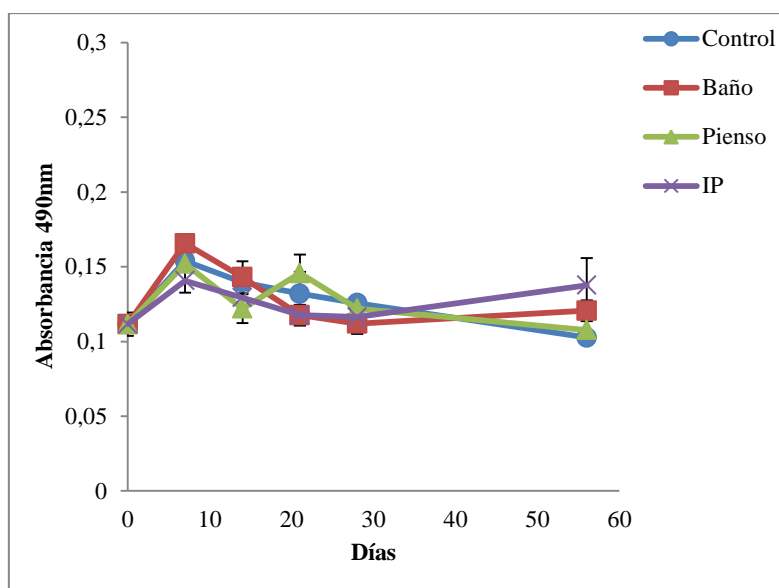


Figura 40. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA con el mucus de piel de peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2 por vía intraperitoneal (IP), por baño o mediante el pienso. Para los ELISA se utilizó la bacteria DCF12.2 como antígeno.

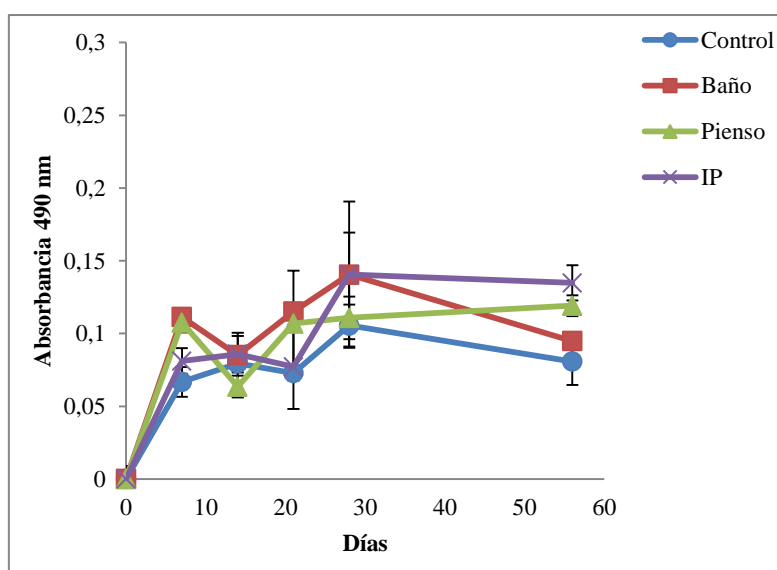


Figura 41. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA con el mucus de piel de peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2 por vía intraperitoneal (IP), por baño o mediante el pienso. Para los ELISA se utilizó *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 como antígeno.

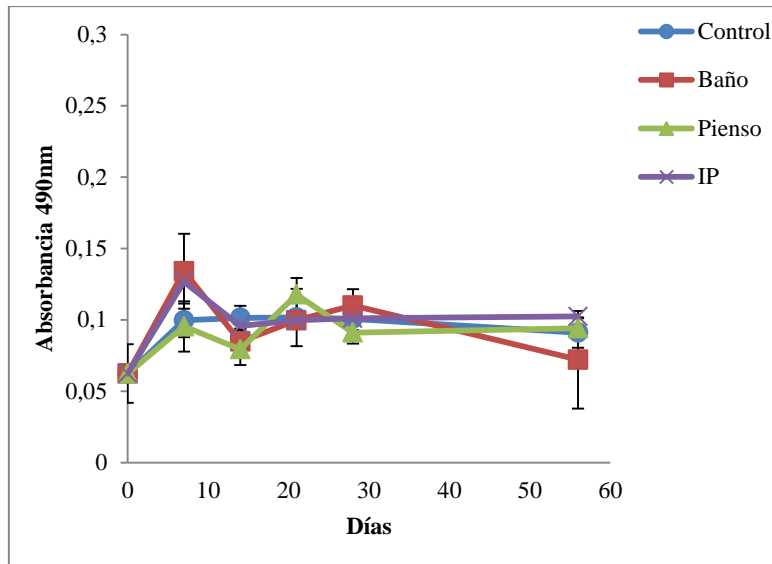


Figura 42. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA con el mucus de piel de peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2 por vía intraperitoneal (IP), por baño o mediante el pienso. Para los ELISA se utilizó *V. harveyi* Lg16.00 como antígeno.

3.2. Expresión de genes implicados en la respuesta inmune innata

La expresión génica se midió a los 3 días y a los 28 días de la administración del potencial probiótico en los lenguados (**Tabla 30**).

A los 3 días, se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en la transcripción de los genes C3, C7, C-LYS, G-LYS, GP96, GPx, HSP70, HSP90AB, IL10, NKEF, NADPHox y SQSTM cuando se administró la bacteria por baño. Cuando el probiótico se administró a través del pienso se incrementó la expresión de los genes C3, C7, G-LYS, GPx, HSP90AB, IL10, NKEF y NADPHox. Mientras que cuando el probiótico se administró de manera intraperitoneal, se observó un incremento en la expresión de los genes HSP90AB, IL10, NKEF y NADPHox.

A los **28 días** de la administración del probiótico se redujo significativamente la expresión de los siguientes genes: C3, C7, C-LYS, G-LYS, GP96, HSP70, HSP90AB y NADPHox cuando el probiótico se administró en baño, mientras que se incrementó la expresión del gen NKEF. Con la administración del probiótico través del pienso se redujo la transcripción de los genes C7 y SQSTM, incrementándose la expresión de los genes G-LYS, GP96, NKEF y NADPHox. Por otra parte, la administración por vía intraperitoneal aumentó significativamente la transcripción de los genes C3, C-LYS, G-LYS, GP96, NKEF y NADPHox, reduciéndose la expresión de los genes C7 y SQSTM.

Es llamativo el hecho, de que de todos los genes estudiados, el gen NKEF fue el que mayor sobreexpresión mostró tanto a 3 días como a 28 días.

Tabla 30. Expresión de genes en el riñón cefálico de lenguados a los 3 y a los 28 días después de que se les administraran *V. proteolyticus* DCF12.2 mediante baño, a través del pienso y por vía intraperitoneal. Los valores de la transcripción en rojo implican una reducción significativa de la expresión respecto los controles, mientras que en verde indican un incremento significativo de la transcripción respecto los controles. Se considera diferencias significativas con $p < 0,05$.

Tiempo	Genes	valores $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$		
		BAÑO	PIENSO	INTRAPERITONEAL
3 días	C3	10,37 ± 1,75	3,72±0,42	1,00 ± 0,11
	C7	10,06 ± 0,57	3,13±0,22	1,44 ± 0,43
	C-LYS	10,27 ± 2,35	1,98±0,94	0,48 ± 0,41
	G-LYS	11,07 ± 2,10	4,87±1,79	0,89 ± 0,26
	GP96	28,62 ± 8,58	0,70 ± 0,86	0,40 ± 0,17
	GPx	61,55 ± 16,13	5,72 ± 2,22	3,72 ± 0,40
	HSP70	10,96 ± 5,21	2,85 ± 1,61	0,71 ± 0,40
	HSP90AB	28,70 ± 9,19	27,80 ± 6,81	9,76 ± 1,64
	IL10	98,30 ± 37,29	59,26 ± 14,11	24,48 ± 0,84
	NKEF	291,50 ± 54,81	79,89 ± 30,82	14,79 ± 0,71
	NADPHox	18,91 ± 5,77	10,09 ± 1,57	2,40 ± 0,05
	SQSTM	17,33 ± 3,58	0,55 ± 0,43	0,26 ± 0,16
28 días	C3	0,02 ± 0,01	1,61 ± 0,26	2,31 ± 0,14
	C7	0,01 ± 0,002	0,73 ± 0,17	0,93 ± 0,34
	C-LYS	0,02 ± 0,003	1,61 ± 0,42	2,31 ± 0,13
	G-LYS	0,11 ± 0,03	1,45 ± 0,10	2,22 ± 0,31
	GP96	0,08 ± 0,03	5,80 ± 3	2,02 ± 0,66
	HSP70	0,13 ± 0,02	0,63 ± 0,18	0,64 ± 0,29
	HSP90AB	0,03 ± 0,01	1,01 ± 0,43	1,12 ± 0,02
	NKEF	65,37 ± 2,20	74,82 ± 7,22	75,44 ± 15,55
	NADPHox	0,02 ± 0,001	1,85 ± 0,26	2,59 ± 0,70
	SQSTM	1,01 ± 0,07	0,44 ± 0,17	0,19 ± 0,01

3.3. Análisis de la microbiota de lenguados tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2

El efecto del probiótico sobre la microbiota intestinal de los peces se determinó mediante DGGE, secuenciando e identificando las bandas predominantes.

3.3.1. Análisis de la microbiota intestinal de lenguados alimentados con *V. proteolyticus* DCF12.2

La mayoría de las bacterias predominantes identificadas a partir de las bandas de DGGE (**Figura 43**) pertenecieron a la clase *GammaProteobacteria*, y sólo una banda se relacionó con otro grupo filogenético, concretamente con *Candidatus Arthromitus sp.* (clase *Clostridia*) (**Tabla 31**).

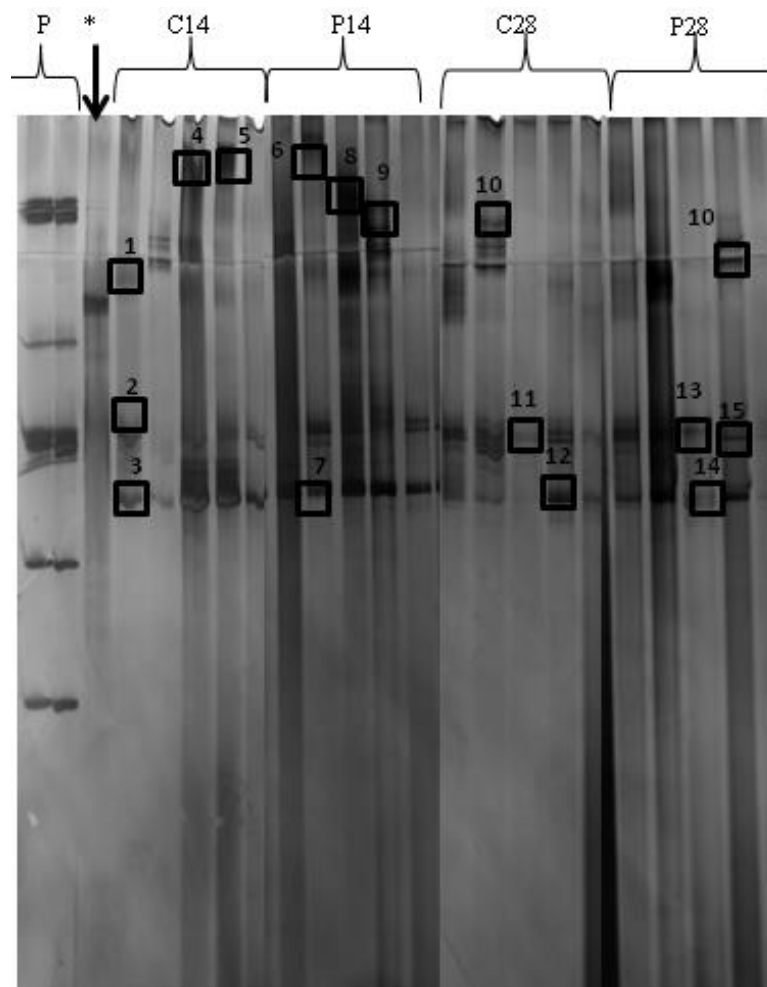


Figura 43. Perfiles de DGGE obtenidos de **mucus intestinal** de lenguados a los que se administró la cepa DCF12.2 en la dieta (P). Las muestras se tomaron a los **14 y 28 días** del inicio del experimento. P: patrón de ADN; P14 y P28: muestras de peces alimentados con la cepa **DCF12.2** tomadas a los días 14 y 28 respectivamente. C14 y C28: muestras de peces controles tomadas a los días 14 y 28 respectivamente. P: patrón de ADN. **Vibrio proteolyticus* DCF12.2. Los cuadros señalan las bandas seleccionadas para su secuenciación.

Tabla 31. Identificación de las bandas predominantes de DGGE en el mucus intestinal de lenguados que recibieron la cepa DCF12.2 a través del pienso. Las muestras se tomaron 14 y 28 días después de iniciado el experimento. En la tabla se expresa el porcentaje de similitud de las secuencias con la base de datos NCBI y su número de acceso.

Tratamiento	Día	Especie	Similitud (%)	Número de acceso	Número de banda
Control	14	<i>Vibrio owensii</i>	90	JX867744.1	1
		<i>Vibrio scophthalmi</i>	100	HG931131.1	2
		<i>Vibrio</i> sp.	87	KM099166.2	3
		<i>Vibrio azureus</i>	97	JN848577.1	4
		<i>Vibrio alginolyticus</i>	98	KM985650.1	5
Pienso	14	Bacteria no cultivable	89	JF072475.1	6
		<i>Vibrio alginolyticus</i>	99	KM985650.1	7
		<i>Vibrio</i> sp.	89	KM099166.2	8
		Bacteria no cultivable	99	KJ197472.1	9
Control	28	Candidatus <i>Arthromitus</i> sp.	98	NR_074450.1	10
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99	KJ643938.1	11
		<i>Vibrio</i> sp.	93	NC_016613.1	12
Pienso	28	<i>Vibrio ichthyoenteri</i>	100	KJ817452.1	13
		<i>Vibrio</i> sp.	90	NC_013457.1	14
		<i>Vibrio</i> sp.	93	NC_016613.1	15

Para poder interpretar los resultados se establecieron dos agrupamientos en base al cálculo del índice de similitud entre las muestras. A los 14 días se observó un agrupamiento en torno al 35 % entre peces alimentados con la cepa DCF12.2. Esta similitud fue aún menor respecto a los peces controles (**Figura 44**), por lo que el probiótico no implicó cambios en la alta variabilidad de los patrones de DGGE. Este agrupamiento no se observó a los 28 días (**Figura 45**), aunque sí indujo diferencias respecto a la alta variabilidad detectada en los controles.

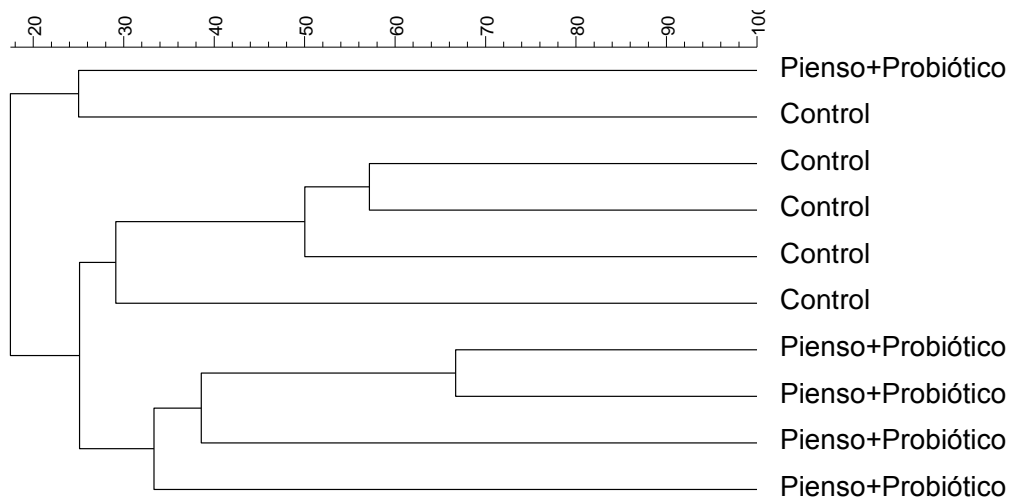


Figura 44. Dendrograma basado en el análisis de similitudes de la microbiota del intestino de lenguados a los que se les administró el probiótico por pienso. Las muestras se tomaron a los **14 días** del inicio del experimento.

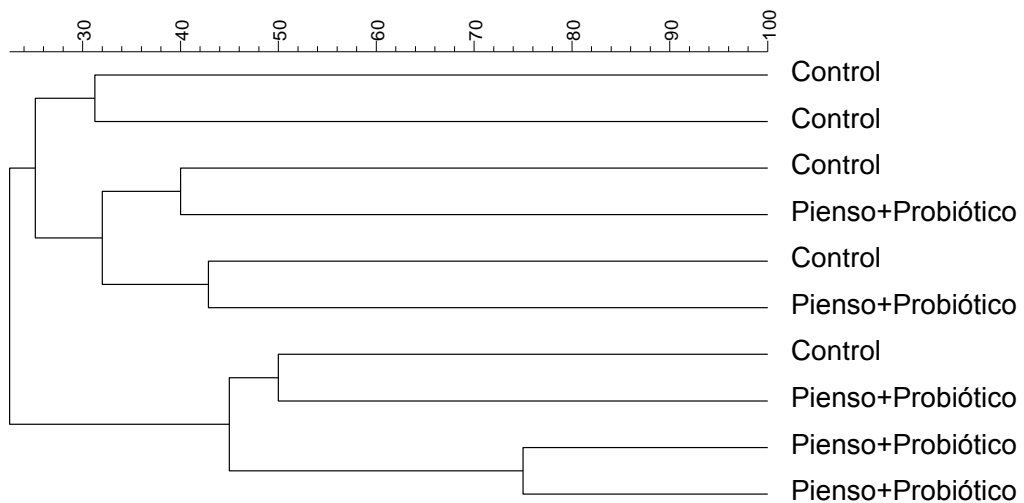


Figura 45. Dendrograma basado en el análisis de similitudes de la microbiota del intestino de lenguados a los que se les administró el probiótico por baño o mediante el pienso. Las muestras se tomaron a los **28 días** del inicio del experimento.

En la **tabla 32** se muestran los valores de habitabilidad (R_r), riqueza de especies (R) y diversidad (H') calculados a partir de los patrones de bandas de DGGE. Tras 14 días de tratamiento, la riqueza de especies aumentó significativamente en la microbiota de los peces que recibieron el probiótico. En el caso de habitabilidad y la diversidad, los valores también fueron significativamente superiores respecto a la dieta control. Por el contrario, a los 28 días esas diferencias desaparecen, no detectándose cambios significativos ($p < 0,05$) de los índices ecológicos entre los distintos tratamientos.

Tabla 32. Valores de habitabilidad (Rr), riqueza específica (R) y diversidad (H') obtenidos tras los análisis de los patrones de bandas de la DGGE de intestinos de lenguados a los que se les administró la cepa **DCF12.2** por pienso, muestreado a los 14 y 28 días. Los datos representan la media \pm el error estándar. Los valores en negrita implican diferencias significativas ($p < 0,05$) del tratamiento respecto al control.

Día de muestreo	Tratamiento	Rr	R	H'
14	Control	2,95 \pm 1,03	4,80 \pm 0,84	1,2 \pm 0,46
	Pienso	10,88 \pm 6,5	9,00 \pm 2,74	1,91 \pm 0,43
28	Control	13,3 \pm 8,69	9,60 \pm 4,22	1,99 \pm 0,59
	Pienso	4,58 \pm 4,28	5,40 \pm 2,88	1,52 \pm 0,49

3.3.2. Análisis de la microbiota de la piel de lenguados tratados por baño con *V. proteolyticus* DCF12.2.

Los patrones de DGGE que corresponden a la microbiota de la piel de los lenguados a los que se les administró el probiótico son representados en la **Figura 46**. Según los datos de la secuenciación de las bandas predominantes de DGGE, todas las bacterias pertenecieron a la clase *GammaProteobacteria* (**Tabla 33**). Tras 56 días de tratamiento, no se pudo establecer un patrón de similitud entre los peces que recibieron la bacteria *V. proteolyticus* **DCF12.2** por baño (**Figura 47**).

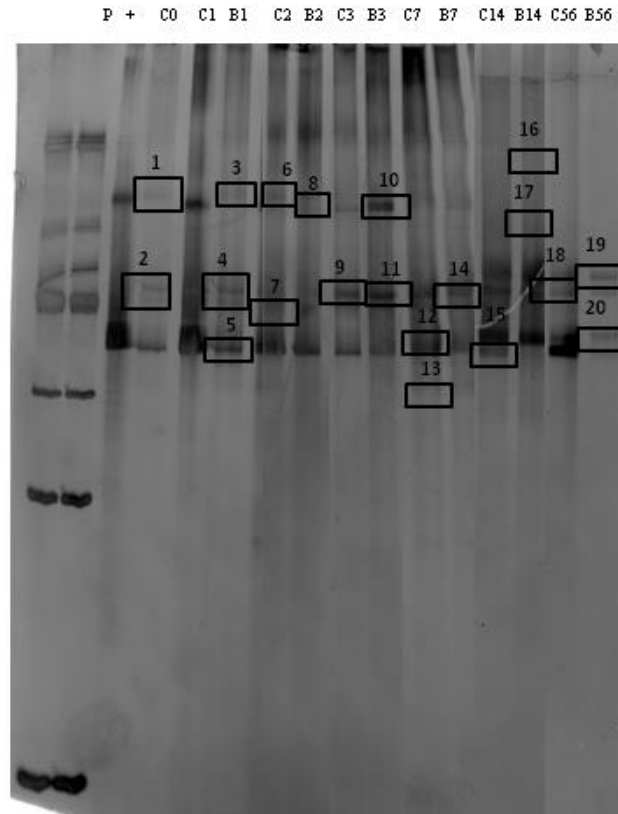


Figura 46. Perfiles de DGGE obtenidos de las muestras de **mucus de piel** de lenguado a los que se administró la cepa DCF12.2 por baño (B) a 0, 1, 2, 3, 7, 14 y 56 días. P: patrón de ADN. **Vibrio proteolyticus* DCF12.2. Los cuadros señalan las bandas seleccionadas para su secuenciación.

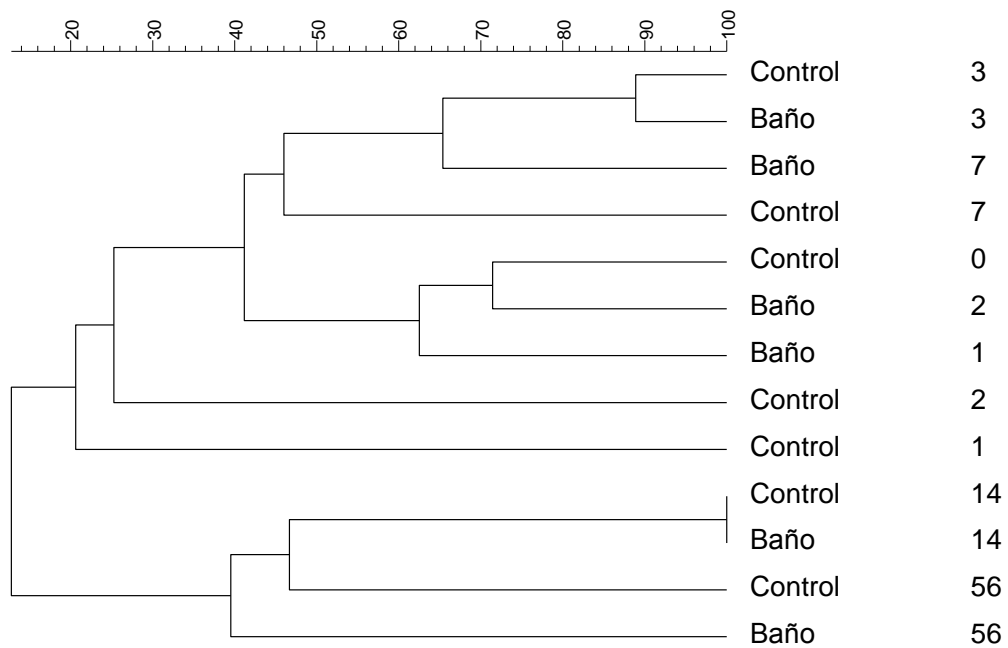


Figura 47. Dendrograma basado en el análisis de similitudes de las muestras de **mucus de piel** de lenguado a los que se administró el probiótico DCF12.2 por baño (B) a 0, 1, 2, 3, 7, 14 y 56 días.

Tabla 33. Identificación de las bandas de DGGE en el mucus de piel de lenguados que recibieron la cepa DCF12.2 por baño. Las muestras se tomaron a 0, 1, 2, 3, 7, 14 y 56 días después de iniciado el experimento. En la tabla se expresa el porcentaje de similitud de las secuencias con la base de datos NCBI y su número de acceso.

Tratamiento	Día	Especie	Similitud (%)	Número de acceso	Número de banda
Control	0	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99	KP219420.1	1
		<i>Vibrio proteolyticus</i>	99	KP640642.1	2
Baño	1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99	KP219420.1	3
		<i>Vibrio proteolyticus</i>	100	KP640642.1	4
		<i>Vibrio rotiferianus</i>	98	GQ454992.1	5
Control	2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	100	KP219420.1	6
		<i>Vibrio harveyi</i>	100	KM881533.1	7
Baño	2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	90	KP219420.1	8
Control	3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99	JF779831.1	9
Baño	3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	96	KP219420.1	10
		<i>Vibrio proteolyticus</i>	93	KP640642.1	11
Control	7	<i>Vibrio rotiferianus</i>	97	HQ449975.1	12
		<i>Pseudoalteromonas</i>	93	FN295826.2	13
Baño	7	<i>Vibrio proteolyticus</i>	100	KP640642.1	14
Control	14	<i>Vibrio vulnificus</i>	99	NC_004460.2	15
Baño	14	Bacteria marina no cultivable	82	GU235273.1	16
		<i>Vibrio</i> sp. no cultivable	97	KJ197733.1	17
Control	56	<i>Shewanella</i> sp. no cultivable	98	KF722216.1	18
Baño	56	<i>Vibrio navarrensis</i>	95	KJ807111.1	19
		<i>Vibrio campbellii</i>	92	KC534402.1	20

Tabla 34. Valores de habitabilidad (Rr), riqueza específica (R) y diversidad (H') obtenidos tras los análisis de los patrones de bandas de la DGGE de **mucus de piel** de lenguados a los que se les administró la cepa DCF12.2 por baño. Las muestras se tomaron a 0, 1, 2, 3, 7, 14 y 56 días.

Día de muestreo	Tratamiento	Rr	R	H'
0	Control	4,5	6	1,71
1	Control	3,13	5	1,47
1	Baño	6,13	7	1,88
2	Control	12,5	10	2,25
2	Baño	4,5	6	1,71
2	Pienso	4,5	6	1,76
3	Control	8	8	1,86
3	Baño	10,3	9	2,03
7	Control	12,5	10	2,28
7	Baño	21,13	13	2,44
14	Control	3,13	5	1,52
14	Baño	3,13	5	1,43
56	Control	1,13	4	1,10
56	Baño	2	4	1,35

3.4. Determinación de la supervivencia de peces administrados con probiótico e infectados con *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*

En la **Tabla 35**, se puede observar que la infección experimental con *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 produjo una mortalidad del 100 % de los controles. Los peces que recibieron por baño el microorganismo propuesto como probiótico tuvieron una mortalidad del 60 %, mientras los peces que recibieron *V. proteolyticus* **DCF12.2** a través del pienso o por vía intraperitoneal mostraron una mortalidad del 70 %. Este porcentaje de mortalidad generó un porcentaje relativo de supervivencia (RPS) del 40 % cuando se administró por baño, y un 30 % cuando el probiótico se administró por vía intraperitoneal o por el pienso.

Tras la infección experimental con *V. harveyi* Lg16.00, los resultados resumidos en la **Tabla 36** mostraron que los controles sufrieron una mortalidad del 60 %. En el caso de los lenguados que recibieron la cepa DCF12.2 por baño o por pienso, se obtuvo una mortalidad del 70 %, no observándose protección. Sin embargo los peces inoculados vía i.p. con el probiótico sufrieron una mortalidad del 20 %, lo que supuso una protección del 67 %.

Tabla 35. Porcentaje de mortalidad en peces inoculados por vía intraperitoneal con *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 en peces controles, y peces a los que se administró el probiótico DCF12.2 por baño, en el pienso o por vía intraperitoneal, así como el porcentaje relativo de supervivencia (RPS).

Tratamiento	Muertos	Supervivientes	Mortalidad (%)	RPS (%)
Control	10	0	100	
Baño	6	4	60	40
Pienso	7	3	70	30
IP	7	3	70	30

Tabla 36. Porcentaje de mortalidad en peces inoculados por vía intraperitoneal con *V. harveyi* Lg16.00 en peces controles, y peces a los que se administró el probiótico DCF12.2 por baño, en el pienso o por vía intraperitoneal, así como el porcentaje relativo de supervivencia (RPS).

Tratamiento	Muertos	Supervivientes	Mortalidad (%)	RPS (%)
Control	6	4	60	
Baño	7	3	70	-
Pienso	7	3	70	-
IP	2	8	20	67

4. Empleo combinado de la cepa *Vibrio proteolyticus* DCF12.2 y de una vacuna bivalente frente *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*

4.1. Determinación de anticuerpos en el suero y mucus de los peces

El título de anticuerpos se realizó mediante ELISA, utilizando como antígenos tanto la cepa **DCF12.2** como los patógenos ensayados.

El título de anticuerpos solo aumentó de manera significativa ($p < 0,05$) en el suero de los peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2 cuando se usó como antígeno la propia cepa. En los demás casos no se observaron diferencias entre peces controles y tratados (**Figura 48**). Por otra parte, no se observaron aumentos significativos en el

título de anticuerpos cuando se utilizaron como antígenos *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 (**Figura 49**) o *V. harveyi* Lg16.00 (**Figura 50**).

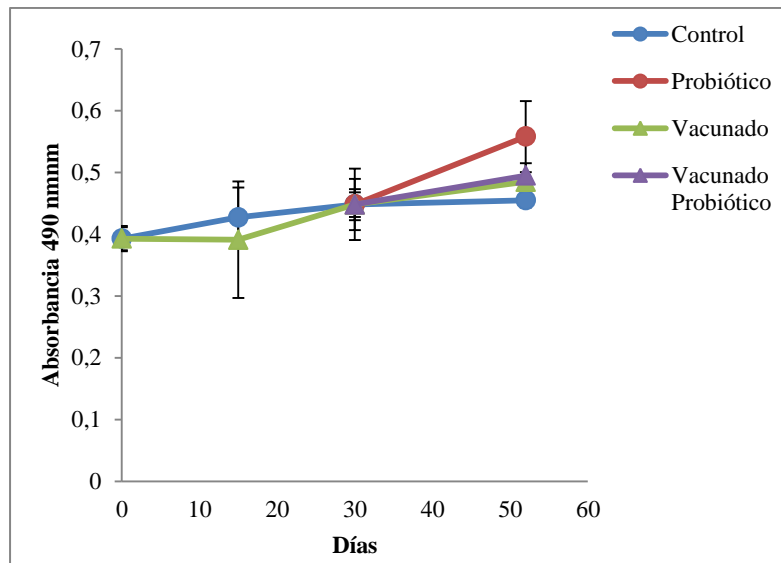


Figura 48. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA con sueros de peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2 por baño, peces vacunados frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00, y peces vacunados a los que se les administró el probiótico. Para los ELISA se utilizó la bacteria DCF12.2 como antígeno y los sueros a una dilución 1/500.

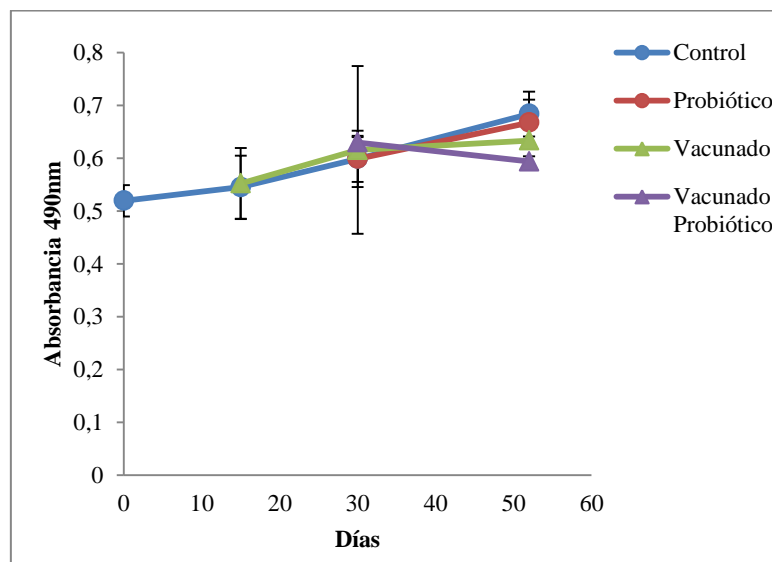


Figura 49. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA con sueros de peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2 por baño, peces vacunados frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00, y peces vacunados a los que se les administró el probiótico. Para los ELISA se utilizó la bacteria *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 como antígeno y los sueros a una dilución 1/500.

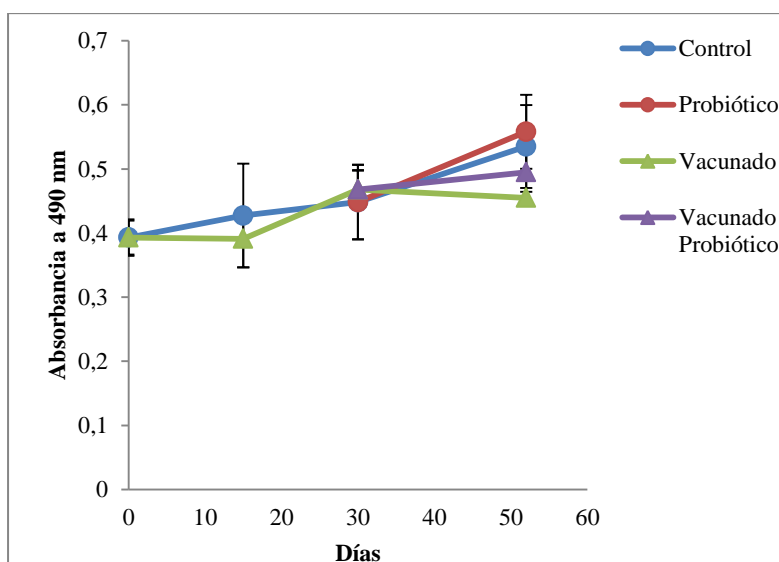


Figura 50. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA con sueros de peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2 por baño, peces vacunados frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00, y peces vacunados a los que se les administró el probiótico. Para los ELISA se utilizó la bacteria *V. harveyi* Lg16.00 como antígeno y los sueros a una dilución 1/500.

En el mucus de la piel de los peces vacunados se detectó diferencias significativas en el título de anticuerpos ($p < 0,05$) a día 15 cuando se utilizó la cepa **DCF12.2** como antígeno en el ELISA (**Figura 52**). Además se detectó un aumento significativo del título de anticuerpos ($p < 0,05$) a día 52 en los peces que recibieron la vacuna y se usó *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 (**Figura 53**) o *V. harveyi* Lg16.00 (**Figura 54**) como antígeno en el ELISA.

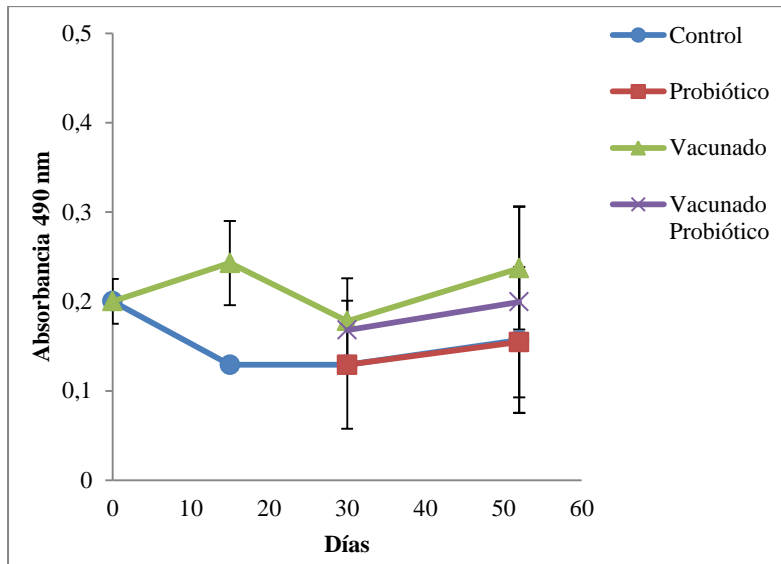


Figura 52. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA de mucus de piel de peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2 por baño, peces vacunados frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00, y peces vacunados con la vacuna bivalente a los que se les administró el probiótico. Para los ELISA se utilizó la bacteria **DCF12.2** como antígeno.

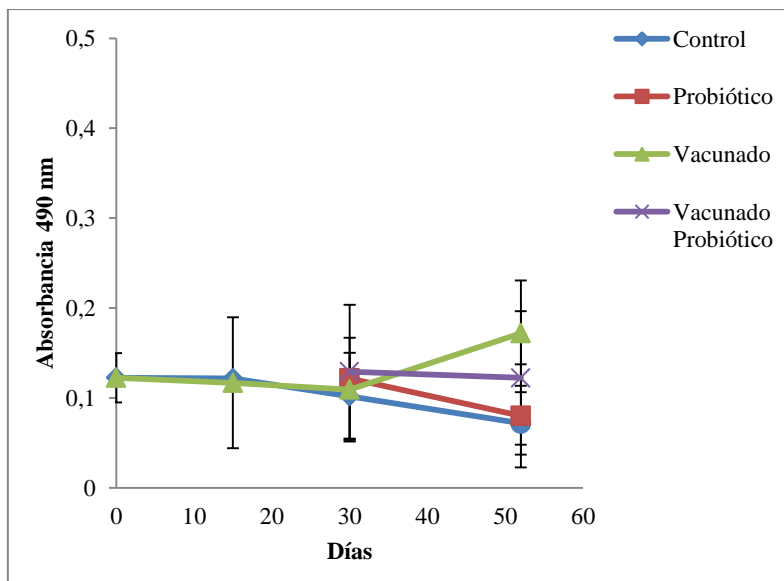


Figura 53. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA de mucus de piel de peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2 por baño, peces vacunados frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00, y peces vacunados con la vacuna bivalente a los que se les administró el probiótico. Para los ELISA se utilizó la bacteria *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 como antígeno.

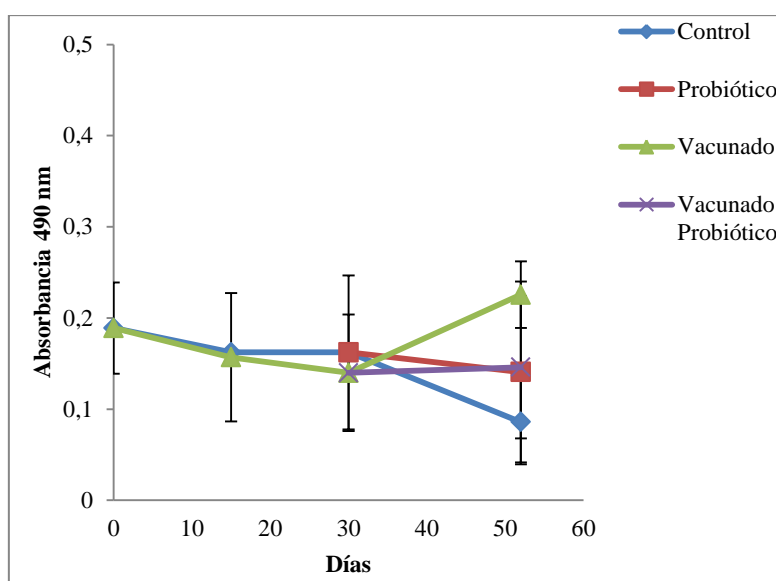


Figura 54. Valores de absorbancia obtenidos mediante ELISA de mucus de piel de peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2 por baño, peces vacunados frente a *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00, y peces vacunados con la vacuna bivalente a los que se les administró el probiótico. Para los ELISA se utilizó la bacteria *V. harveyi* Lg16.00 como antígeno.

4.2. Análisis de la microbiota de la piel

Tras realizar el análisis por DGGE del mucus de piel de los lenguados a 15, 30 y 52 días del comienzo del experimento, se identificó cierta uniformidad en el número de bandas de cada calle, con una media de seis bandas predominantes en todas las muestras. Sin embargo, existieron diferencias con respecto a la posición de algunas de las bandas en los peces que recibieron el probiótico a los 15 días y los peces vacunados a los 52 días respecto al resto de tratamientos (**Figura 55**).

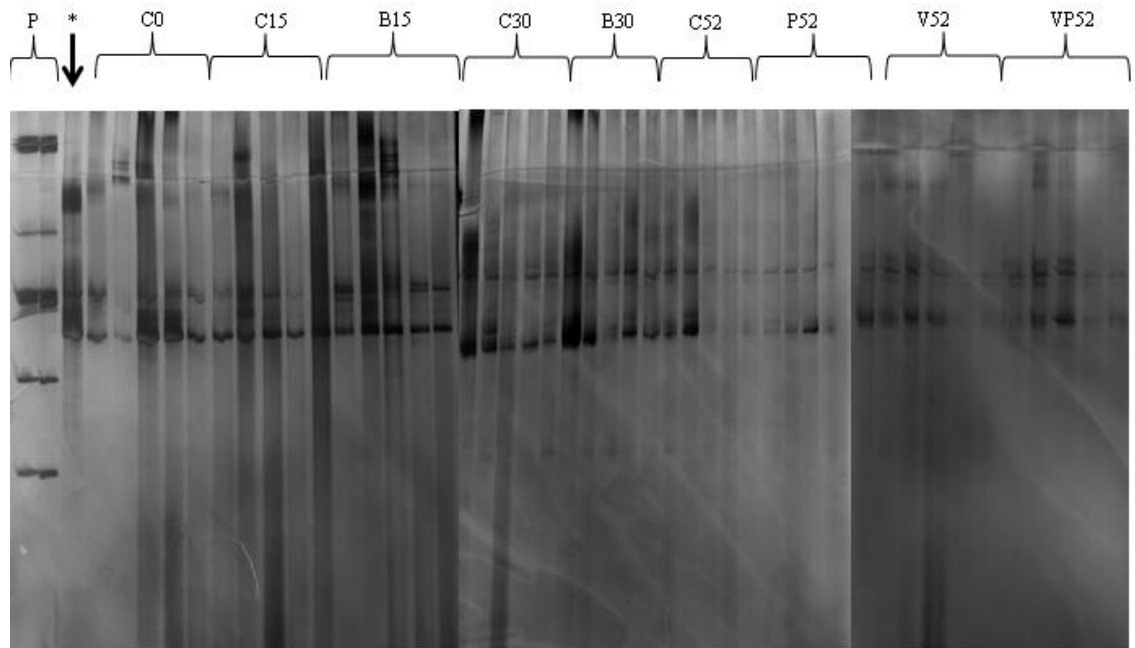


Figura 55. Perfiles de DGGE obtenidos de las muestras de **mucus de piel** de lenguados tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2 por baño (B), peces vacunados frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00 (V) y peces vacunados a los que se les administró el probiótico (VP). Los números 0, 15, 30, y 52 indican el día de muestreo. El patrón (P) se muestra en el margen izquierdo. El asterisco muestra la calle correspondiente a *V. proteolyticus* DFC12.2.

En el dendrograma originado por el cálculo de los índices de similitud entre las muestras, pudieron observarse diferencias en la composición de la microbiota entre peces vacunados y controles a día 15, teniendo el 80 % de los individuos vacunados una similitud del 40 % entre sí (**Figura 56**), aunque esta similitud se perdió a día 30 (**Figura 57**). Por otra parte se vieron diferencias a día 52 entre los peces vacunados (independientemente del tratamiento posterior) y los no vacunados (ya fueran controles o tratados con el probiótico) (**Figura 58**).

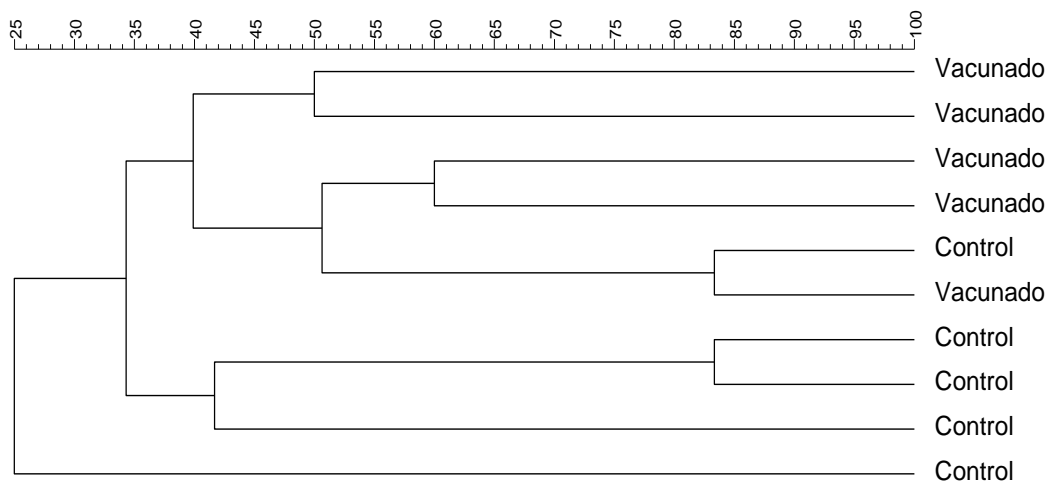


Figura 56. Dendrograma basado en el análisis de similitudes entre la microbiota de la piel de peces controles y peces vacunados con una vacuna frente a *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00. El muestreo se realizó a los **15 días** del inicio del experimento.

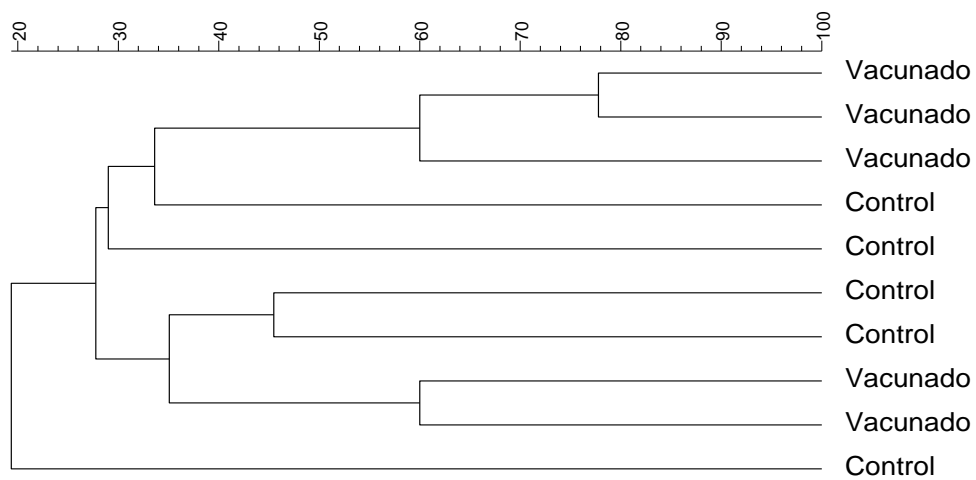


Figura 57. Dendrograma basado en el análisis de similitudes entre la microbiota de la piel de peces controles y peces vacunados frente a *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00. El muestreo se realizó a los **30 días** del inicio del experimento.

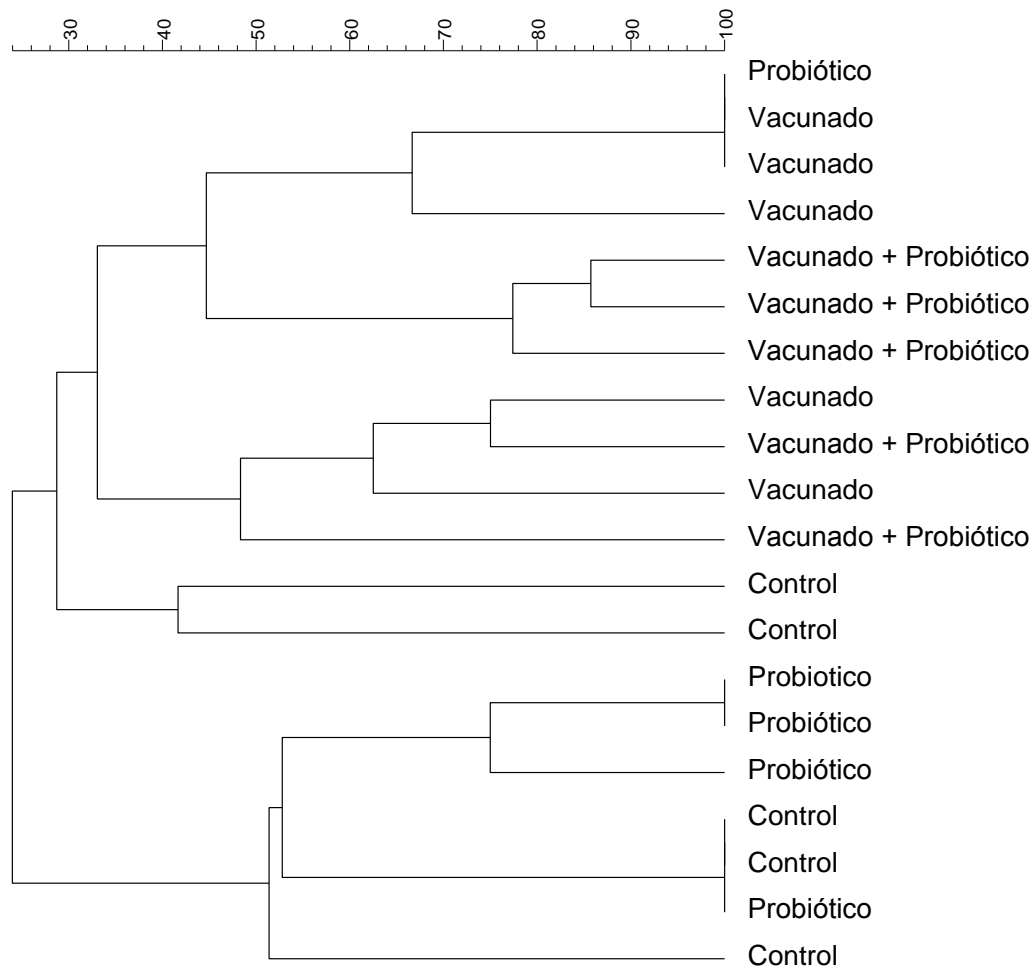


Figura 58. Dendrograma basado en el análisis de similitudes entre la microbiota de la piel de peces controles, peces vacunados frente a *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00, peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2 por baño (Probiótico), y peces vacunados a los que se les administró el probiótico (Vacunado+Probiótico). El muestreo se realizó a los **52 días** del inicio del experimento.

Para determinar la estructura de la comunidad microbiana correspondiente a los patrones de bandas, se calcularon los índices ecológicos de habitabilidad, riqueza específica y diversidad, no observándose diferencias significativas de los parámetros ecológicos de los peces tratados respecto a los controles (**Tabla 37**).

Tabla 37. Valores de habitabilidad (Rr), riqueza específica (R) y diversidad (H') obtenidos tras los análisis de los patrones de bandas de la DGGE de mucus de piel de peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2 por baño, peces vacunados frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00, y peces vacunados a los que se les administró el probiótico. Los datos representan la media \pm el error estándar.

Día	Tratamiento	Rr	R	H'
0	Control	4,48 \pm 2,50	5,80 \pm 1,64	1,60 \pm 0,25
15	Control	3,88 \pm 1,87	5,40 \pm 1,52	1,54 \pm 0,30
	Vacunado	5,68 \pm 2,71	6,60 \pm 1,52	1,73 \pm 0,19
30	Control	10,3 \pm 8,86	8,40 \pm 3,85	1,89 \pm 0,46
	Vacunado	5,28 \pm 3,41	6,20 \pm 2,17	1,72 \pm 0,38
52	Control	4,05 \pm 4,64	4,80 \pm 3,42	1,30 \pm 0,68
	Vacunado	2,65 \pm 1,73	4,40 \pm 1,52	1,40 \pm 0,37
	Probiótico	1,68 \pm 1,60	3,40 \pm 1,52	1,11 \pm 0,37
	Vacunado + Probiótico	3,38 \pm 1,99	5,00 \pm 1,58	1,50 \pm 0,36

4.3. Infecciones experimentales con los patógenos y determinación del grado de protección de los tratamientos

Los porcentajes de mortalidad y RPS de los peces infectados con *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 o *V. harveyi* Lg16.00 se muestran en las **Tablas 38 y 39**.

La infección experimental con *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 generó una mortalidad del 100 % de los controles, mientras que la mortalidad de los peces vacunados fue del 70 % y los que recibieron únicamente el probiótico tuvieron una mortalidad del 90 %. Sin embargo los peces que recibieron la combinación vacuna-probiótico tuvieron una mortalidad del 60 %. Estos datos de mortalidad se tradujeron en valores de RPS del 10 % en peces que recibieron el probiótico como único tratamiento, del 30 % en peces vacunados y del 40% en peces tratados con la combinación vacuna-probióticos (**Tabla 38**).

En el caso de los peces infectados con *V. harveyi* Lg16.00, los peces controles tuvieron una mortalidad del 100 %, mientras que los peces que recibieron el probiótico y/o la vacuna bivalente sufrieron una mortalidad del 50 %. Por tanto, los peces evidenciaron un RPS del 50 % en todos los tratamientos (**Tabla 39**).

Tabla 38. Porcentaje de mortalidad producido por *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 en peces controles, peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2, peces vacunados frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00, y peces vacunados a los que se les administró el probiótico. RPS: porcentaje relativo de supervivencia.

Tratamiento	Muertos	Supervivientes	Mortalidad (%)	RPS (%)
Control	10	0	100	
Probiótico	9	1	90	10
Vacunado	7	3	70	30
Vacunado + Probiótico	6	4	60	40

Tabla 39. Porcentaje de mortalidad producido por *V. harveyi* Lg16.00 en peces controles, peces tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2, peces vacunados frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00, y peces vacunados a los que se les administró el probiótico. RPS: porcentaje relativo de supervivencia.

Tratamiento	Muertos	Supervivientes	Mortalidad (%)	RPS (%)
Control	10	0	100	
Probiótico	5	5	50	50
Vacunado	5	5	50	50
Vacunado + Probiótico	5	5	50	50

DISCUSIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Obtención de anticuerpos de *Solea senegalensis* frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi* e identificación de las proteínas más inmunogénicas

Obtención de anticuerpos frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* e identificación de las proteínas más inmunogénicas

Cuando se inocularon los peces con bacterina y ECP de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01, en los peces sometidos a una dosis no se observaron diferencias significativas en la producción de anticuerpos específicos respecto el control, mientras que en los peces reinoculados presentaron un título significativo de anticuerpos tanto para la bacteriana como para los ECP.

La inmunización de los peces con bacterina y ECP se encuentra justificada al existir respuesta inmune frente a los ECP, tal como apoyan otros estudios (Bakopoulos *et al.*, 2003; Arijó *et al.*, 2005b; Ho *et al.*, 2011).

Las diferencias entre los resultados obtenidos con la primera y la segunda inmunización pueden estar condicionadas por el uso de adyuvante de Freund en la segunda inoculación (Firdaus-Nawi *et al.*, 2013; Tafalla *et al.*, 2013). Los adyuvantes aumentan el tiempo de exposición del antígeno en el individuo, al liberar el antígeno de forma lenta y continua. Otra función del adyuvante es la de transportar antígenos solubles que no suelen ser reconocidos por el sistema inmune (Fodey *et al.*, 2008).

Para la identificación de las proteínas más reactivas se utilizaron los sueros de los peces inoculados por segunda vez, ya que estos fueron los que dieron mejor producción de anticuerpos específicos. El análisis se realizó inicialmente mediante un *Western blot* a partir de un SDS-PAGE, detectándose varias bandas reactivas con los sueros de los peces inmunizados. Sin embargo esta técnica no permite separar de forma adecuada las proteínas para su posterior secuenciación e identificación, ya que proteínas distintas pueden compartir el mismo peso molecular (Beranova-Giorgianni, 2003; Eubel *et al.*, 2005). Por este motivo se optó por realizar los *Western blot* a partir de electroforesis bidimensionales, donde se separaron las proteínas tanto por su peso molecular como por su punto isoeléctrico (Cordero *et al.*, 2016; Shiu *et al.*, 2017; Wang, L. *et al.*, 2017).

Cuando se realizaron los *Western blot* a partir de geles 2D, se detectaron menos proteínas reactivas que las observadas en geles de una dimensión. Esto puede ser debido a que, al aumentar la superficie de electroforesis en la 2D, se produce una dispersión de las proteínas, disminuyendo su concentración, y por tanto disminuyendo su señal.

El análisis con *Western blot* 2D mostró la existencia de dos proteínas altamente reactivas en los ECP de *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01, mientras que en los *Western blot* 2D a partir de OMP se detectaron tres proteínas altamente reactivas.

En los ECP se identificaron una metaloproteasa dependiente de ATP y una proteína que confiere resistencia al telurito, ambas con un papel relevante en la virulencia y en la resistencia antimicrobiana (Taylor, 1999; Haag *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009). Las proteasas dependientes de ATP son las proteasas catalíticas más diversas y juegan un papel muy importante como proteínas reguladoras tanto en procariontes como en eucariotes (Langer, 2000), rompen proteínas transmembranales y activan factores de patogenicidad mediante ATP extracelular (Haag *et al.* 2007; Imamura, 2009; Zhou *et al.*, 2009; Defoirdt, 2014). Respecto a la proteína resistente a telurito, su principal función es proteger contra las defensas del hospedador, interactuando contra las sustancias tóxicas producidas por macrófagos u otras defensas celulares (Taylor, 1999; Passet y Brisse, 2015).

Dos de las proteínas más inmunogénicas que se hallaron en las OMP de *P. damselae* subsp. *piscicida* Lg41.01, fueron una citocromo c nitrato reductasa (Nrfa) y unas peroxidoxinas, moléculas muy importantes para evadir la respuesta oxidativa del sistema inmunitario del hospedador. La proteína nitrato reductasa disminuye el impacto del óxido nítrico generado por la respuesta inmune, reduciendo el óxido nítrico a óxido nítrico de forma independiente a la presencia de oxígeno (Cross, 2001; Richardson, 2006; Vázquez-Torres y Bäumlér, 2016). La familia de las peroxidoxinas, formada por proteínas como la alquil hidroperóxido reductasa C (AhpC) y la proteína antioxidante específica de tiol (Tsa), protegen al patógeno frente especies reactivas de oxígeno generadas por la reducción del oxígeno hacia agua (McGonigle, 1998; Kaihimi *et al.*, 2014). Finalmente, la OMP-3 coincidió con una proteína con dominio de unión a ADN que confiere resistencia al estrés relacionado con el frío, aunque no se posee hasta la fecha demasiada información sobre la importancia inmunológica de esta proteína (Zhu *et al.*, 2017).

La identificación realizada por Mascot se hizo en base a la secuencia de aminoácidos, coincidiendo la identificación en un 100% en todos casos. Sin embargo el peso molecular de las proteínas aisladas del gel no coincidió con el peso molecular de la proteína identificada por Mascot. Esta falta de correlación se puede deber a la falta de información en bases de datos de proteínas sobre animales cultivados y sus patógenos (Soares *et al.*, 2012), o a la ruptura de las proteínas durante su obtención, en el proceso de desnaturalización o en la posterior electroforesis (Dunbar *et al.*, 1990; Mahmood y Yang, 2012).

Obtención de anticuerpos frente a *V. harveyi* e identificación de sus proteínas más inmunogénicas

La inmunización con bacterina y ECP de *V. harveyi* Lg16.00, provocó un aumento significativo en el título de anticuerpos en el pez. Este resultado está en concordancia con otros estudios similares, como el realizado en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inmunizada frente a *V. harveyi* Lg16.00 (Arijo *et al.* 2008). El título de anticuerpos en los sueros de peces que fueron reinoculados con *V. harveyi* Lg16.00 solo aumentó un orden de dilución respecto a los peces inmunizados una sola vez. Este resultado puede ser explicado por el uso de adyuvante incompleto de Freund desde la primera inmunización. El adyuvante permite la liberación lenta del antígeno, por lo que la estimulación del sistema inmune se alarga en el tiempo, pero cuando se realiza la segunda inoculación estos peces siguen teniendo antígenos de la primera inmunización (Fodey *et al.*, 2008).

La electroforesis con las fracciones proteicas de *V. harveyi* Lg16.00 presentó un patrón de bandas similar tanto en la fracción de las OMP como en la fracción de los ECP. Este resultado pudo ser debido a la presencia de proteínas comunes en ambas preparaciones de proteínas, tal como detectaron Zeng *et al.* (2015) en una preparación de vacunas frente *Leptospira interrogans*.

Asimismo se llevó a cabo la identificación de las proteínas de *V. harveyi* Lg16.00 que dieron más reacción en el *Western blot* a partir de electroforesis bidimensional. En total se identificaron 5 proteínas reactivas en los ECP, mientras que fueron 2 las proteínas con fuerte señal detectadas en las OMP.

La mancha proteica 1 de ECP se identificó como una maltoporina. Las maltoporinas facilitan la translocación de maltodextrinas a través de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, y son indispensables para la difusión de grandes moléculas como maltooligosacaridos (Oldham *et al.*, 2013). El conocimiento sobre el papel inmunogénico de las maltoporinas en *V. harveyi* es escaso, aunque se conoce el carácter inmunogénico de estas regiones en algunas bacterias. Por ejemplo, Lång *et al.* (2000) propusieron la utilización de vacunas enriquecidas en maltoporinas para el desarrollo de una vacuna frente *Vibrio cholerae*. La utilización de maltoporina en una vacuna frente *V. harveyi* puede estar justificada si consideramos que esta proteína inoculada en ciprínidos confirió protección frente *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* (Khushiramani *et al.*, 2012). La mancha 2 de ECP es homóloga a una fosfohidrolasa dependiente de metal, que juega un papel importante en las fases de infección de algunos microorganismos. Así, Kaito *et al.* (2005) demostraron que los mutantes de *Staphylococcus aureus* en proteínas con estos motivos mostraron una menor producción de hemolisina y ADNasa respecto a la cepa sin mutación. Las manchas 3 y 4 de ECP se identificaron como isoformas de porinas de *V. harveyi*. Las porinas forman canales formados por pequeñas moléculas hidrofílicas y están relacionadas en el transporte de nutrientes, antibióticos y otros moduladores. Además, las porinas forman parte de componentes inmunogénicos relevantes en vibrionáceas (Chakrabarti *et al.*, 1996; Pang *et al.*, 2010). Finalmente, la mancha 5 fue homóloga a una proteína de división celular FtsH, una peptidasa esencial en la adaptación a la respuesta por estrés (Langklotz *et al.*, 2012). Aunque es necesario aumentar el conocimiento sobre como las proteasas contribuyen a la patogénesis, se ha dilucidado que la proteasa FtsH es una diana importante para el diseño de una terapia antimicrobiana hacia su dominio extracelular. Se ha comprobado que la síntesis del lipopolisacárido, esencial para las bacterias Gram negativas, se debe a la proteína FtsH (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005; Le Loir *et al.*, 2005; Rodríguez-Ortega *et al.*, 2006; Böttcher y Sieber, 2008; Ingmer y Brøndsted, 2009; Langklotz *et al.*, 2011). Aunque estas proteínas se encuentran localizadas en la membrana celular, tienen un dominio extracelular; por tanto, su detección como proteína extracelular en *V. harveyi* Lg16.00 se puede deber a contaminación con células lisadas en el método de extracción de los productos extracelulares.

En relación con las OMP de *V. harveyi* Lg16.00 secuenciados, la mancha 1 de OMP fue identificada como una proteína 3-hidroxi-isobutirato deshidrogenasa. Esta proteína se encarga de oxidar la molécula 3-hidroxi-isobutirato a metilmalonato-semialdehído (Titball y Petrosino, 2007). Además esta proteína está relacionada con el transporte lipídico. Sin embargo, su papel en la virulencia y en la activación del sistema inmune del pez no se encuentra todavía definido. La mancha 2 de OMP se identificó como la proteína fosfatasa ácida. La actividad de la fosfatasa ácida ha sido descrita en varias vibrionáceas (Ridgway *et al.*, 2008; Hidalgo *et al.*, 2009; Soto-Rodriguez *et al.*, 2012; Khouadja *et al.*, 2017). El papel de la fosfatasa ácida como factor de virulencia en las bacterias es poco conocido, aunque ha sido demostrado su papel en la proliferación celular (Saha *et al.*, 1985), bloqueando la producción de especies reactivas de oxígeno por parte de neutrófilos, y así contribuye a su patogenicidad (Small *et al.* 2007).

La existencia de anticuerpos específicos para estas proteínas no implica que dichas proteínas sean las más idóneas para inmunizar y proteger a los peces frente a las infecciones. Pueden existir proteínas que, por su pequeña cantidad en las muestras, no produzcan una fuerte reacción en los *Western blot*, y sin embargo sus anticuerpos sí sean útiles para opsonizar o inactivar a las bacterias patógenas (Mahmood, y Yang, 2012). Por otra parte en las bacterias también existen fracciones no proteicas que son inmunogénicas, como la fracción del lipopolisacárido, que debido a su origen no proteico no puede ser visualizado en una electroforesis. Estos componentes bacterianos también deben ser tomados en cuenta a la hora de conocer cómo actúa el sistema inmune específico sobre las bacterias.

2. Selección y caracterización de probióticos potenciales con similitud antigénica y capacidad antagónica frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.00 y *V. harveyi* Lg16.00

En el segundo capítulo se identificaron y se caracterizaron cepas bacterianas cuya característica principal era poseer antígenos comunes frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*. En un primer paso de la selección se utilizó la técnica de *dot blot* para la identificación de las bacterias con mayor similitud antigénica frente a los

patógenos estudiados. La técnica de *dot blot* se utiliza de manera rutinaria, sin perder especificidad y sensibilidad, para la detección de anticuerpos (Wang y Zhan, 2006; Longyant *et al.*, 2008), y se ha mejorado en vibrionáceas (Qadri *et al.*, 1994).

Aunque la técnica es eminentemente cualitativa, en este trabajo se aplicó un método semi-cuantitativo consistente en la medida de la intensidad de señal con un escáner y un programa de análisis de imagen. Esto ha permitido discernir entre resultados leves (semejantes a los resultados negativos) y resultados claramente positivos (muy parecido a los valores de reacción del control positivo), al medir la intensidad media de cada cepa y posteriormente relativizar el valor de cada cepa con su correspondiente control positivo. Como criterio de cribado se eligieron aquellas cepas que presentaban una intensidad media semejante o superior a un 75 % respecto al control positivo. Este límite se estableció subjetivamente para limitar el número de cepas a ensayar. La medida de intensidad de señal mediante análisis de imagen supone una nueva aplicación del *dot blot* que facilita el trabajo de selección de grandes cantidades de antígenos.

Así, de las 718 cepas analizadas, se seleccionaron 138 cepas. Con estas cepas se realizaron ensayos conducentes a conocer su capacidad de inhibición del crecimiento de los patógenos. La inhibición del crecimiento entre bacterias es un fenómeno común en la naturaleza, y que suele ser una de las primeras características que se determinan en la selección de un probiótico (Arevik *et al.*, 2015). Para su detección se utilizó la técnica de inhibición en placa, ya que es rápida y económica, facilitando el procesamiento de una gran cantidad de cepas bacterianas (Saint-Cyr *et al.*, 2016).

De las 138 cepas utilizadas en los ensayos de inhibición, se detectaron 7 cepas que inhibían el crecimiento de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01, 7 cepas que inhibían el crecimiento de *V. harveyi* Lg16.00 y 2 cepas que inhibían el crecimiento de ambos patógenos. Esta capacidad inhibitoria que producen las cepas probióticas está asociada a diferentes factores como puede ser la producción de bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, proteasas, ácidos grasos de cadena corta (Verschuere *et al.*, 2000) y la acidificación del medio (Fernández *et al.*, 2013).

A priori, la selección de cepas bacterianas por inhibición de crecimiento del patógeno, es uno de los métodos más rápidos de preselección masiva de probióticos. Indudablemente puede que existan bacterias que se hayan descartado y presenten otras propiedades probióticas, pero este método es el que consigue de manera rápida y eficaz

una primera selección de cepas. No era la finalidad de este trabajo adentrarse en el tipo de sustancias antibacterianas que producen las cepas probióticas preseleccionadas (bacteriocinas, ácidos orgánicos...), aunque sería interesante iniciar su estudio detallado en posteriores trabajos. Por otra parte, el hecho de que una bacteria inhiba el crecimiento de patógenos *in vitro* no implica que tenga un efecto beneficioso en el hospedador, por lo que se hace necesaria una evaluación de la bacteria *in vivo*.

Finalmente, para confirmar que las cepas preseleccionadas tenían antígenos comunes con los patógenos, se realizaron *Western blots* de las proteínas de membrana. Para comprobar la existencia de antígenos comunes, se eligió la fracción de las OMP porque son componentes bacterianos altamente inmunogénicos, debido a que tienen epítomos expuestos en la superficie celular. La homología entre las OMP explicaría las reacciones cruzadas entre bacterias Gram negativas (Xu, C. *et al.*, 2005; Lun *et al.*, 2014).

Los probióticos potenciales seleccionados pertenecieron al género *Vibrio*, y más concretamente, **DCF12.9**, **DCF12.10** y **PLSW5** se identificaron como *V. alginolyticus*. A pesar de ser una especie con cepas patógenas sobre todo en crustáceos (Lee, K. K. *et al.*, 1996), se han identificado cepas probióticas de *V. alginolyticus* (Gatesoupe, 1990; Austin *et al.*, 1995; Zherdmant *et al.*, 1997; Verschuere *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2007b). Por ejemplo Austin *et al.*, (1995) aumentaron la supervivencia del salmón (*Salmo salar*) frente *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Vibrio ordalii* mediante el uso de una cepa probiótica de *V. alginolyticus*. Del mismo modo Zherdmant *et al.*, (1997) utilizaron *V. alginolyticus* en larvas de moluscos acuáticos debido a su efecto inhibitorio sobre *V. harveyi*. En el caso de la cepa **DCF12.2**, ésta se identificó como *V. proteolyticus*. Aunque se ha descrito una cepa patógena de *V. proteolyticus* frente a *Artemia* spp. (Verschuere *et al.*, 2000), Schrijver y Ollevier (2000) describieron el uso probiótico de *V. proteolyticus* para mejorar la digestión proteica en el rodaballo (*Scophthalmus maximus*).

Uno de los principales criterios para confirmar la seguridad de los probióticos en sanidad animal es la ausencia de patogenicidad, en base a los criterios de Aly *et al.* (2008). Todas las cepas seleccionadas para estos ensayos se pueden considerar no patógenas para el lenguado, debido a que no murió ningún pez con una dosis elevada del probiótico por vía intraperitoneal, A pesar de haberse demostrado la inocuidad en lenguados, esto no implica que las cepas ensayadas no sean patógenas para otras

especies, por lo que se necesitarán estudios complementarios ensayando las cepas con otras especies acuáticas del mismo entorno donde se vayan a administrarse (Austin *et al.*, 1995; Gatesoupe, 2005; Zhou y Wang, 2012; Pandiyan *et al.*, 2013).

Otra de las pruebas realizadas consistió en ver la capacidad de las cepas seleccionadas de inducir la producción de anticuerpos, y si estos daban reacción cruzada con los antígenos de los patógenos ensayados. Las cepas **DCF12.2**, **DCF12.10** y **PLSW5** indujeron la producción de anticuerpos en el lenguado tras a los 30 días de la inoculación por vía intraperitoneal. Otros autores también han estudiado la capacidad de producción de anticuerpos por parte de los probióticos (Al-Dohail *et al.*, 2009; Sun, Y. Z. *et al.*, 2010; Korkea-aho *et al.*, 2011; Giri *et al.*, 2013), viéndose que esta producción de anticuerpos puede generar protección en el pez (Bricknell *et al.*, 1999; Nayak *et al.*, 2007; LaPatra *et al.*, 2014). La detección de anticuerpos que reconocieron los antígenos de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00 pudo deberse a las reacciones cruzadas de los anticuerpos inducidos por los probióticos y las cepas patógenas (Nayak *et al.*, 2007; Wang, J. T. *et al.*, 2013; LaPatra *et al.*, 2014).

Una vez detectada la reacción cruzada entre potenciales probióticos y los patógenos ensayados, se determinó qué proteínas podrían estar relacionadas con esa reacción cruzada. Para ello se realizaron *Western blots* con proteínas de las cepas ensayadas, cruzando nuevamente los sueros de peces inmunizados con los antígenos de los patógenos.

Cuando se utilizó sueros de peces inmunizados frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* se observó que una proteína transportadora de maltosas de la membrana externa de la cepa **DCF12.9** dió una mayor reacción. Este tipo de proteínas actúa como transportador de moléculas relacionadas con la patogénesis, como proteasas (Davidson y Chen, 2004). Por esta razón se han diseñado vacunas que actúan contra moléculas de este tipo (Tanabe y Grenier, 2009). La proteína que generó una reacción más intensa en la cepa **DCF12.10** fue una alanina deshidrogenasa. La alanina deshidrogenasa es una enzima que interviene en el metabolismo de los aminoácidos y tiene importancia antigénica en ciertos patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* (Saxena *et al.*, 2015) Las proteínas más reactivas de la cepa **PLSW5** fueron una proteína transportadora ABC transductora de señales y una fosfatasa periplásmica. La proteína transportadora ABC transductora de señales se ha detectado en bacterias del género *Vibrio* en respuesta a medios deficientes de hierro (Miyamoto *et al.*, 2009). Por otra parte, La fosfatasa

periplásmica es esencial en la configuración del lipopolisacárido bacteriano, tal como comprobaron Wang *et al.* (2007) en mutantes de *Francisella tularensis*.

Al enfrentar los sueros de peces inmunizados frente a *V. harveyi* con los OMP de la bacteria **DCF12.2**, las proteínas más inmunorreactivas que se identificaron fueron unas proteínas transportadoras ABC, una permeasa del tipo A, y una proteína transportadora de tipo TAXI. Las proteínas transportadoras ABC son proteínas especializadas en el transporte activo de diversas sustancias, como bacteriocinas, a través de la membrana celular mediante la hidrólisis de ATP. Además tienen un papel importante en diversas rutas de biosíntesis de moléculas, como polisacáridos extracelulares (Davidson *et al.*, 2008). Estas proteínas son unas de las más inmunogénicas entre las proteínas de membrana, y se han usado como vacunas recombinantes (Zou *et al.*, 2011) y como diana de antimicrobianos (Garmory y Titball, 2004). Las proteínas transportadoras tipo TAXI también son encargadas del transporte activo de sustancias en procariontes pero de manera independiente al ATP (Mulligan *et al.*, 2011) y también se ha comprobado que tienen otras funciones, como configurar el lipopolisacárido de ciertas bacterias (Jenkins *et al.*, 2010), o favorecer su colonización intestinal (Plumbridge y Vimr, 1999). Las proteínas más reactivas de la cepa **DCF12.9** fueron una proteína transportadora ABC, una proteína transportadora ABC de maltosas, la proteína de membrana externa OmpA y una proteína inmunogénica sin caracterizar. Numerosas porinas de membrana externa son de tipo OmpA (Wang, Y., 2002) y su función está ampliamente documentada en *Enterobacteriaceae* (Maiti *et al.*, 2011). Estas proteínas se han considerado candidatas para el desarrollo de vacunas (Confer y Ayalew, 2013). Por ejemplo, se ha comprobado que una vacuna recombinante con proteínas de *Flavobacterium psychrophilum* es capaz de producir una fuerte respuesta inmune en trucha (Dumetz *et al.*, 2007), *Edwardsiella tarda* en *Paralichthys olivaceus* (Kawai *et al.*, 2004) o *Edwardsiella tarda* en la carpa (Maiti *et al.*, 2011).

Las proteínas más reactivas detectadas en las OMP de las cepas **DCF12.2**, **DCF12.9**, **DCF12.10** y **PLSW5**, no coincidieron con las identificadas como inmunogénicas en *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*. Esto puede ser debido a que las proteínas comunes de cada cepa están en distinta proporción. Así, al realizar los *Western blots* e identificar exclusivamente las proteínas con mayor señal en el *Western blot*, no aparecieron proteínas comunes entre probióticos y patógenos. Por otra parte también hay que tener en cuenta que la reacción cruzada podría estar más relacionada

con otros antígenos como los lipopolisacáridos (Caroff y Karibian, 2013) y otras fracciones bacterianas no proteicas (Swain *et al.*, 2003) que la técnica de *Western blot* usada en este trabajo no detectaría esas moléculas (Stein *et al.*, 1990; Sambrook y Russell; 2001).

Estudios complementarios de las cepas seleccionadas como potencialmente probióticas

Una vez seleccionadas las cepas en base a sus antígenos comunes, su capacidad antagonista y su inocuidad, se valoró su capacidad de supervivencia en condiciones de almacenamiento y administración a los peces en una piscifactoría.

Determinación de la susceptibilidad de las cepas frente antibióticos

La sensibilidad de las cepas a los diferentes antibióticos es un criterio importante en la búsqueda de probióticos. Para el uso de probióticos es recomendable no usar cepas con resistencias a antibióticos, ya que esta resistencia se podría transferir a cepas patógenas (Van den Bogaard y Stobberingh, 2000; Kim, S. R. *et al.*, 2004; Cabello, 2006). El antibiograma realizado a las cepas seleccionadas muestra su sensibilidad a la mayoría de los antimicrobianos estudiados. Entre los antibióticos en los que las cepas fueron sensibles destacamos la oxitetraciclina y la tetraciclina, antibióticos usados como primera opción en acuicultura, sobre todo en el tratamiento de la fotobacteriosis (Millán y Pérez 2017; Mo *et al.*, 2017), Excepto la cepa **DCF12.10**, las cepas presentaron resistencia a la eritromicina, una resistencia común en el género *Vibrio* (Snoussi *et al.*, 2008). Solo las cepas **DCF12.9** y **PLSW5** fueron resistentes a amoxicilina y ampicilina, dos antibióticos que se pueden usar en acuicultura según el reglamento europeo, y concuerda con los estudios de Teo *et al.* (2002) según los cuales muchos antibióticos β -lactámicos no consiguen prevenir la vibriosis. La cepa *V. proteolyticus* **DCF12.2** no presentó resistencia frente a ningún antibiótico. Esto implica que las cepas seleccionadas, y en especial la cepa *V. proteolyticus* **DCF12.2**, no suponen un vector potencial de genes de resistencia a los antibióticos, y por tanto su uso no interfiere en la eficacia del uso de antibióticos como control de enfermedades bacterianas.

Supervivencia en agua de mar y supervivencia a 4 °C

Los resultados mostraron que todas las cepas se mantuvieron viables en agua de mar durante al menos 5 días, por lo que sería factible administrar el probiótico en baño. Esta vía de administración del probiótico puede ser útil ya que evita la manipulación de los peces, por tanto el estrés (Fast *et al.*, 2008; Plant y LaPatra, 2011; Parra *et al.*, 2015).

Con la finalidad de observar si las bacterias permanecían viables en frío y así comprobar su posibilidad de almacenamiento en refrigeración las cepas preseleccionadas se incubaron en solución salina a 4 °C. Los resultados indicaron que las bacterias permanecían viables durante al menos 5 días, aunque hubo una disminución considerable de la concentración de células viables. Debido a las bajas temperaturas, las bacterias ralentizan su metabolismo, lo que permite su permanencia bajo dicho estrés, y se previene la acumulación de metabolitos tóxicos respecto a temperaturas superiores (Kirsop y Doyle, 1991). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Armada *et al.* (2003) en el estudio de la viabilidad de varias especies del género *Vibrio* en los medios acuáticos naturales.

Supervivencia a la liofilización

La liofilización es una de las opciones para el almacenamiento de probióticos. Esta forma de conservación permite mantener la viabilidad de las células en periodos prolongados y de forma independiente a la temperatura (Ratti *et al.*, 2001; Santivarangkna *et al.*, 2006;). Sin embargo, el principal inconveniente que presenta dicho proceso es la disminución del número de células viables debido a la congelación y posterior deshidratación, siendo la supervivencia variable dependiendo de la cepa (Gaden *et al.*, 1992; Peiren *et al.* 2015). Se ha comprobado que el impacto negativo de la liofilización para las bacterias Gram negativas es mucho mayor que para las bacterias Gram positivas (Janning y In't Veld, 1994). Debido a esto, se determinó la viabilidad de cada potencial probiótico tras su liofilización. En todos los casos se pudieron recuperar células viables de todos los procesos de liofilización, ya fuera con el uso o sin el uso de crioprotectores. El uso de crioprotectores en algunos casos es innecesario para permitir la viabilidad de las bacterias al proceso de liofilización (Damodharan *et al.*, 2015).

Supervivencia en el pienso

El estudio de la supervivencia de los probióticos en el pienso es fundamental para conocer la viabilidad de su administración por vía oral y la posibilidad de almacenamiento de la mezcla pienso-probiótico. Mantener la viabilidad de los probióticos añadidos al alimento para los peces es uno de los aspectos más importantes para asegurar su efecto beneficioso (Merrifield *et al.*, 2010a). Existen diferentes factores causantes de esta pérdida de viabilidad, siendo la temperatura de almacenamiento del pienso uno de los factores que comprometen la viabilidad del probiótico en el pienso (Newaj-Fyzul *et al.*, 2007).

Los resultados mostraron la supervivencia de las bacterias seleccionadas en el pienso, a pesar de sufrir una caída en el número de células viables durante las primeras 24 h. Otros estudios también han observado la capacidad de las bacterias de sobrevivir en el pienso (Rengpipat *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 2007; Sahu *et al.*, 2008). En los casos donde se almacenó la mezcla pienso-probiótico a 4 °C, la supervivencia de las bacterias pudo deberse a la reducción del metabolismo de las bacterias y una menor acumulación de sustancias tóxicas (Bernardeau *et al.*, 2001). En el caso de la pérdida de viabilidad de las bacterias en el pienso congelado, pudo deberse a los daños producidos en la bacteria por la formación de cristales de hielo (Kirsop y Doyle, 1991).

No se observó una diferencia de viabilidad entre la administración con solución salina o con alginato. Se evitó la utilización de alginato porque, aunque se ha comprobado la efectividad de la administración de un probiótico mediante alginato en el lenguado (Rosas-Ledesma *et al.*, 2012), también se ha constatado que el alginato puede alterar la microbiota intestinal y ser inmunoestimulante (Skjermo y Bergh, 2004; Cheng, W. *et al.*, 2005; Tafaghodi *et al.*, 2006; Peso-Echarri *et al.*, 2012) y por tanto enmascarar el posible efecto del probiótico.

En base a los resultados de viabilidad, en los ensayos de administración de la cepa en el pienso se optó por suspender las bacterias en solución salina justo antes de su administración a los peces, evitando de esa manera pérdida de viabilidad debida al almacenamiento, o el potencial efecto inmunomodulador que pudiese realizar el alginato.

Determinación de las actividades enzimáticas

Para conocer si los potenciales probióticos analizados son capaces de facilitar la digestibilidad de determinados compuestos, y por tanto facilitar los procesos de asimilación de nutrientes por parte de los peces, se estudiaron las actividades enzimáticas presentes en los mismos. Todas las cepas presentaron las actividades enzimáticas estudiadas: amilasa, lipasa caseinasa, gelatinasa y lecitinasa.

Las actividades **lipasa** y **amilasa** permiten la degradación de lípidos y carbohidratos respectivamente. La bacterias con estas actividades enzimáticas pueden ser beneficiosas para el hospedador ya que, cuando se instalan en el intestino, permiten la descomposición de azúcares y lípidos, favoreciendo su absorción intestinal (Merrifield *et al.*, 2010a; Ganguly y Prasad, 2012; Ray *et al.*, 2012). Por ejemplo Mohapatra *et al.* (2012) observaron que cuando se alimentaban individuos de la especie *Labeo rohita* con una mezcla de *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* y *Saccharomyces cerevisiae* aumentaba la producción de estas enzimas digestivas. A pesar de lo comentado anteriormente, estas enzimas bacterianas pueden ser consideradas como factores de virulencia, (Quesada-Herrera *et al.*, 2004). Varias lipasas, como la glicerofosfolípido colesterol aciltransferasa (GCAT) y la lecitinasa-fosfolipasa C (Plc) se han asociado con la patogenicidad en peces de diversas bacterias (Vipond *et al.*; 1998; Merino *et al.*; 1999; Su *et al.*, 2004).

La actividad **caseinasa** se ha caracterizado en bacterias psicrófilas marinas (Prasad *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016), bacterias halófilas aisladas en salinas (Biswas y Paul, 2013; Obeidat *et al.*, 2017), como también en bacterias que podrían ser utilizadas en determinados procesos de biorremediación (Kiran *et al.*, 2015). Se ha detectado actividad caseinasa en bacterias probióticas (Mahdhi *et al.*, 2011; Martínez-Hidalgo *et al.*, 2014) sobre todo en bacterias relacionadas con el género *Bacillus* (Mahdhi *et al.*, 2012; Merghni *et al.*, 2014; Ambas *et al.*, 2015; David *et al.*, 2016). Mahdhi *et al.* (2012) concluyeron que la actividad caseinasa era una de las estrategias que podían poseer las bacterias para resistir la ausencia de nutrientes. La actividad caseinasa ha sido identificada como positiva en bacterias ácido lácticas potencialmente probióticas en productos relacionados con la leche (Cebrián *et al.*, 2012).

La actividad **gelatinasa** ha sido identificada en bacterias probióticas del género *Bacillus*, sobre todo en bacterias con interés industrial que convierten compuestos insolubles en monómeros solubles (De Clerck *et al.*, 2004; Schallmey *et al.*,

2004; Su *et al.*, 2017), participando en la inhibición de bacterias patógenas (Banerjee *et al.*, 2007) o favoreciendo el crecimiento de especies con interés económico (Boonthai *et al.*, 2011).

La actividad **lecitinasa** es la encargada de la hidrólisis de la fosfatidilcolina. La actividad lecitinasa suele encontrarse en las bacterias del género *Vibrio* (Esselmann y Liu, 1961) y se encuentra ampliamente distribuida en bacterias del medio ambiente (Ruíz-García *et al.*, 2005; Yadav *et al.*, 2014; Bunpa *et al.*, 2016; Galach'yants *et al.*, 2016). Por ejemplo, Bunpa *et al.* (2016) describieron las actividades lecitinasa, caseinasa y gelatinasa en cepas de *V. alginolyticus* procedentes de agua de mar y sedimento marino. Además se han identificado bacterias con actividad *quorum quenching* y que poseían actividad lecitinasa (Han *et al.*, 2010).

Por tanto, estas cepas presentan unas actividades enzimáticas también halladas en otros probióticos y que podrían favorecer en conjunto la digestibilidad en el hospedador. Hay que tener en cuenta, la ayuda en la digestión de nutrientes es uno de los parámetros más importantes a la hora de seleccionar probióticos (Ramirez y Dixon, 2003; Ziaei-Nejad *et al.*, 2006; Lazado *et al.*, 2012; Ray *et al.*, 2012).

Evaluación del crecimiento en medios con diferentes pH

Es importante en cualquier selección de probióticos que dichas bacterias posean una serie de propiedades que garanticen su efecto en el hospedador, como es la supervivencia de la cepa a un pH ácido, ya que eso le permitiría atravesar el estómago de algunos peces sin verse inactivadas por el bajo pH (Fjellheim *et al.*, 2010; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). Para evaluar el crecimiento en diferentes pH se sembraron las cepas en caldos nutritivos con diferente acidez.

Todas las cepas vieron afectadas su crecimiento en un medio con pH ácido, tal como describieron estudios anteriores con diversas vibrionáceas como *Vibrio angillarum* (Frans *et al.*, 2011); *V. cholerae* (Labas *et al.*, 2002); *V. harveyi* (Prayitno y Latchford, 1995); *V. parahaemolyticus* (Beuchat, 1973; Wong y Wang, 2004) y *Vibrio vulnificus* (Bang y Drake, 2005). La principal actividad digestiva en los lenguados reside en el intestino, a diferencia de otros peces que poseen una fuerte actividad ácida en su estómago (Sáenz de Rodrigáñez *et al.*, 2005). Yúfera y Darías (2007) concluyeron que el pH gástrico de *S. senegalensis* se sitúa por encima de 6,0 en todas las etapas de crecimiento de este pez, alcalinizándose en las regiones posteriores del intestino. Este

valor de este pH es debido a la dieta omnívora de estos peces. Por tanto, la viabilidad de estas cepas potencialmente probióticas administradas oralmente sería posible en estas condiciones de pH.

Evaluación del desarrollo de la cepa V. proteolyticus DCF12.2 en presencia de bilis y diferentes pH

Aplicando los postulados de Merrifield (Merrifield *et al.*, 2010a) se preseleccionó la cepa **DCF12.2** para su estudio *in vivo* en *S. senegalensis* tras los procesos de selección anteriores debido a una serie de características favorables que se encontraron en dicha cepa. Esta cepa, además de tener características similares a las demás cepas, no es patógena en peces, posee capacidad antagónica frente *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00, es viable en condiciones de almacenamiento, produce enzimas extracelulares beneficiosos para la digestión, no es resistente a antibióticos de uso cotidiano en acuicultura, y crece a un pH ligeramente ácido. Asimismo, los peces inmunizados con la cepa **DCF12.2** produjeron un título de anticuerpos alto frente la cepa inmunizada (con una o dos inmunizaciones), y los anticuerpos generados presentaron reacción cruzada frente *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*.

El sistema gastrointestinal contiene una microbiota compleja que condiciona la secreción de sustancias antimicrobianas, ácidos, sales biliares y diversas enzimas que crea un ambiente hostil para muchos patógenos (Gómez y Balcázar, 2007). Para que un probiótico pueda conferir características beneficiosas para el hospedador, el probiótico debe sobrevivir el paso del sistema gastrointestinal. Por ese motivo dos de las propiedades fundamentales para analizar en las bacterias probióticas son la tolerancia al pH ácido del estómago y a la bilis en el intestino (Pérez-Sánchez *et al.*, 2014).

La bilis funciona como un detergente biológico emulsionando y solubilizando lípidos, por lo que tiene un papel fundamental en la digestión de grasas. Además, la bilis tiene una importante actividad antimicrobiana porque desestabiliza la membrana celular mediante una reacción de deconjugación por hidrolasas de las sales biliares (Hidalgo *et al.*, 1999; Begley *et al.*, 2005). La cepa *V. proteolyticus* **DCF12.2** fue tolerante a todas las concentraciones de bilis ensayadas, aunque fue afectada de manera negativa cuando la concentración de bilis en el medio fue superior a un 3 % de bilis. Sin embargo hay que tener en cuenta que este ensayo se llevó a cabo con una concentración de bilis extremadamente alta a la comparada por otros estudios. Por ejemplo, Chen *et al.* (2016)

realizaron ensayos *in vitro* con una concentración de bilis entre 0,15 y 0,3 %. Balcázar *et al.* (2008) estimaron que la concentración de bilis en el tracto gastrointestinal de salmónidos estaba entre 0,4 y 1,3 %.

En cuanto al crecimiento de la cepa *V. proteolyticus* **DCF12.2** a un pH ácido, se pudo observar un decrecimiento significativo con un pH igual a cuatro en la primera hora del ensayo, aunque existió crecimiento bacteriano. Esto no tendría que ser un gran problema para su administración en los lenguados puesto que el estómago del lenguado suele tener un pH ligeramente alcalino (Yúfera y Darias, 2007) y el tiempo de evacuación del alimento ingerido suele ser corto (Ringø *et al.*, 2003). Además este ensayo se hace *in vitro* por lo que no se puede concluir que la cepa no pueda colonizar el intestino porque la bacteria se puede mezclar con el alimento y por tanto que la acción de un pH ácido no sea tan agresiva (Nikoskelainen *et al.*, 2001).

Por tanto, la cepa *V. proteolyticus* **DCF12.2** fue resistente a una alta concentración de sales biliares y a un pH moderado. El pH gastrointestinal del lenguado, siempre por encima de un valor de 6.0 (Yúfera y Darias, 2007), permite la adaptabilidad de esta cepa al sistema digestivo del lenguado, por lo que el probiótico podría sobrevivir en el tracto gastrointestinal.

3. Efecto de la cepa *Vibrio proteolyticus* DCF12.2 sobre el sistema inmunitario de lenguados y protección frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*

Detección de anticuerpos

La administración intraperitoneal del probiótico supuso un incremento significativo de los niveles de anticuerpos a los 14 días de la administración. Estos resultados coinciden con los observados en la trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*) vacunadas frente a *Flavobacterium psychrophilum* por baño y por vía intraperitoneal (Makesh *et al.*, 2015). En general, la administración intraperitoneal es la vía más efectiva en la inmunización de un pez (Plant y LaPatra, 2011). Esto puede ser lógico, puesto que los antígenos han sido directamente inyectados, por lo que no sufren la degradación en el digestivo y/o en el mucus de la piel. En el resto de tratamientos

aplicados en nuestro estudio no existió un incremento significativo de anticuerpos, lo que nuevamente coincide con lo informado por Makesh *et al.* (2015). Existen sin embargo otras investigaciones con probióticos en las que se hallaron aumentos significativos en el título de anticuerpos séricos del pez al administrar probióticos a través de la dieta (Al-Dohail *et al.*, 2009; Reyes-Becerril *et al.*, 2011; Korkea-aho *et al.*, 2012). Hay que destacar que la ausencia de niveles significativos de anticuerpos en peces inmunizados no siempre puede suponer ausencia de protección debido a la activación de mecanismos celulares y no humorales (Magariños *et al.*, 1994c). Por otro lado, se detectaron que los anticuerpos séricos generados daban reacción cruzada con los patógenos cuando la cepa **DCF12.2** se administró por vía intraperitoneal. Con los demás tratamientos no se observaron incrementos significativos de reacción cruzada. Esto puede ser debido a que los antígenos comunes entre las bacterias no sean los más abundantes, por lo que producen una reacción no perceptible.

Cuando se estudió la producción de anticuerpos secretores en el intestino, se vio un aumento significativo de anticuerpos frente *V. proteolyticus* **DCF12.2**, que además dieron reacción cruzada frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y a *V. harveyi* Lg16.00 en todos los ensayos. Esto puede indicar que se están produciendo anticuerpos secretores, resultados coincidentes con los observados por Makesh *et al.* (2015) aunque esto no se refleje necesariamente en un aumento de anticuerpos séricos. Esto puede ser debido a que los antígenos bacterianos hayan actuado sobre el tejido linfoide asociado al intestino del pez, y por tanto de manera independiente a otros órganos hematopoyéticos (Lazado y Caipang, 2014).

Con la administración oral de *V. proteolyticus* **DCF12.2** también se obtuvo un nivel significativo de anticuerpos. Esto concuerda con investigaciones en las que los peces inmunizados por vía oral presentaron anticuerpos específicos en la mucosa intestinal. Por ejemplo, Esteve-Gassent *et al.* (2004) detectaron en anguilas (*Anguilla anguilla*) niveles significativos de anticuerpos en la mucosa intestinal después de ser reinmunizadas frente a *V. vulnificus*. También Irie *et al.*, (2005) detectaron anticuerpos específicos en la mucosa intestinal pero en carpas (*C. carpio*) inmunizadas oralmente con liposomas que contenían antígenos de *A. salmonicida*.

En general, la cantidad de anticuerpos observados en el mucus intestinal fue bajo. Uno de los motivos de esta baja detección puede estar en la existencia, en el mucus, de enzimas proteolíticas que destruyen rápidamente gran parte de los

anticuerpos secretados. Hatten *et al.* (2001) identificaron mediante *Western blot* que existía degradación de los anticuerpos del salmón atlántico (*Salmo salar*) al añadir mucus intestinal. Además, los peces pueden secretar anticuerpos de mucosa intestinal (IgT), incapaces de ser reconocidos por las anti-IgM (Zhang, Y. A. *et al.*, 2010). Sin embargo, en este trabajo se pudo detectar anticuerpos secretores utilizando anti-Ig M del suero, lo que podría indicar un cierto grado de semejanza entre anticuerpos séricos y secretores.

La administración intraperitoneal supuso un incremento significativo en la secreción de anticuerpos en el mucus de la piel a los 56 días de la inoculación del probiótico, datos similares a los obtenidos por Makesh *et al.* (2015). Estos anticuerpos aparecieron más tarde en el mucus de la piel que a nivel sistémico, de igual forma que lo observado por Song *et al.* (2006) al administrar por vía oral *Clostridium butyricum* a *Miichthys miiuy*. Una parte de la producción de IgM puede realizarse en órganos hematopoyéticos (como riñón y bazo), y luego ser transportados por el sistema circulatorio hasta el mucus de la piel (Cain *et al.*, 2000). También podría existir un transporte de células B productoras de Ig hasta las mucosas (Swan *et al.*, 2008), o ser transportadas por receptores específicos en la superficie de las mucosas (Xu *et al.*, 2013).

Por su parte, la administración del probiótico mediante la dieta no supuso cambios significativos del título de anticuerpos en el mucus de la piel. Estos resultados están contrastados con lo informado por Song *et al.* (2006), quienes observaron la estimulación en la producción de anticuerpos del moco de la piel en peces administrados con piensos complementados con el probiótico *Clostridium butyricum*. La estimulación de la mucosa de la piel en los ensayos mediante la inmunización mediante baño no consiguió que se incrementara el título de anticuerpos en el mucus, tal como observaron (Makesh *et al.* (2015), lo que contrasta con los resultados de otras investigaciones donde el mayor título de anticuerpos se encontró tras una inmunización por baño respecto la administración oral e intraperitoneal (Xu, Z. *et al.*, 2009; Song-Lin *et al.*, 2014).

Expresión de genes implicados en la respuesta inmune innata

A nivel global, tanto a día 3 como a día 28 del inicio del ensayo, existió una activación o inhibición diferencial de genes relacionados con el sistema inmune dependiente del tratamiento.

Los genes relacionados con el **complemento** se sobreexpresaron a los 3 días de administrar la bacteria por baño o a través del pienso, en tanto que cuando se administró el probiótico por vía intraperitoneal esta sobreexpresión se observó a los 28 días. Esto coincide con otras investigaciones en las que vio un aumento en la expresión de este gen al administrar un probiótico en la dieta (Salinas *et al.*, 2008). El complemento es uno de los principales componentes humorales de la respuesta inmune innata de los peces (Boshra *et al.*, 2006; Korotaevskiy *et al.*, 2009), entre cuyas funciones se encuentra la lisis de patógenos y el inicio de respuestas inflamatorias. De esta forma, la sobreexpresión de C3 indicaría que la bacteria seleccionada podría favorecer actividades como la fagocitosis, en tanto que el incremento de C7 podría sugerir un aumento de la capacidad de lisis del patógeno mediante la rotura de su membrana. Todo esto podría mejorar la protección de los peces a las enfermedades (Li *et al.*, 2017). Además, la activación del sistema del complemento puede significar una indicación del bienestar animal porque el complemento está asociado a mecanismos de tolerancia al estrés (Jin *et al.*, 2015), tal como demuestran estudios que relacionan determinados agentes estresantes como la falta de espacio o infecciones con la inhibición de los genes que transcriben el sistema del complemento (Mauri *et al.*, 2011; Tort, 2011).

El gen que codifica a la **glutación peroxidasa (GPx)** aumentó su transcripción cuando el probiótico se administró por baño y por pienso a los 3 días del inicio. La glutación peroxidasa es una de las principales enzimas relacionadas con la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013). Aunque las moléculas ROS activan la respuesta inflamatoria en la respuesta inmune, estas moléculas pueden provocar daño celular en los tejidos del organismo. La glutación peroxidasa funciona como un sistema enzimático que protege contra estos residuos. Existen publicaciones que detectaron un aumento de la expresión de la glutación peroxidasa cuando se administraron probióticos a peces. El aumento de la expresión de la GPx concuerda con los estudios en el riñón cefálico de *Gadus morhua* y *Epinephelus coioides* que recibieron una dieta complementada con probióticos de

Pseudomonas y *Psycrhobacter* (Lazado *et al.*, 2010) y *Lactobacillus plantarum* (Son *et al.*, 2009); y en el intestino de lenguado senegalés con una dieta enriquecida en probióticos como *Shewanella putrefaciens* PDP11 (Vidal *et al.*, 2016) y las bacterias *Bacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp., y *Lactobacillus* sp. (Batista *et al.*, 2016).

Al igual que en el caso anterior, se pudo detectar a los 3 días un aumento de la expresión del gen de la **lisozima** cuando el probiótico se administró en el baño o por el pienso; y a los 28 días del tratamiento cuando el probiótico se administró por el pienso y por vía intraperitoneal. También se detectó esta activación de la lisozima en trabajos donde se aplicaron probióticos como *Bacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp. en el lenguado senegalés (Batista *et al.*, 2016). Asimismo, la administración de *Bacillus subtilis* en ejemplares de tilapia (*Oreochromis niloticus*) supuso el incremento de los niveles de lisozima y la resistencia a *Streptococcus iniae* (Addo *et al.*, 2017). A los 28 días se redujo la transcripción del gen de la lisozima, posiblemente debido al tiempo transcurrido desde la inoculación del probiótico. Según Balcázar *et al.* (2007a), la inoculación del probiótico *Lactobacillus sakei* en la trucha común (*Salmo trutta*) no produjo un incremento en la actividad lisozima, aunque sí hubo un incremento cuando se inocularon otras bacterias ácido lácticas. Las lisozimas tienen un papel muy importante a la hora de proteger a los organismos frente a infecciones (Zhou *et al.*, 2016). Es una enzima ampliamente distribuida en los tejidos del pez y cataliza la rotura de la capa de peptidoglicano causando la lisis bacteriana (Fu *et al.*, 2013). Además de su actividad antimicrobiana, puede tener otras funciones como estimular el crecimiento (Wang y Zhang, 2010), mejorar la biodegradación (Xin *et al.*, 2015), además de poseer actividad antiviral (Velmurugan *et al.*, 2015).

Se observó una reducción significativa de la transcripción de los **genes codificantes de las proteínas de choque térmico (HSP)** tal como ocurre al administrar el probiótico en baño 28 días atrás. Esto puede estar asociado con procesos de supervivencia celular ante el estrés oxidativo. Las HSP actúan como chaperonas moleculares y median en la reparación y degradación de proteínas (Benítez-Dorta *et al.*, 2013; Lei *et al.*, 2015). Además de comportarse como chaperona molecular en situaciones de estrés medioambiental, la **GP96** es capaz de modular la inmunidad celular (Sung y MacRae, 2011), ya que es una chaperona localizada en el retículo endoplasmático e interactúa con los receptores de las células presentadoras de antígeno,

favoreciendo su maduración y por tanto mejorando la respuesta inmune innata como adaptativa (Strbo y Podack, 2008). En nuestro ensayo existió un aumento de la expresión del gen GP96, tal como se detectó en el hígado de lenguado senegalés alimentados con el probiótico PDP11 (*Shewanella putrefaciens*) (Tapia-Paniagua *et al.*, 2015) y además Batista *et al.*, (2016) detectaron un aumento de la expresión de este gen en el intestino distal de lenguado senegalés alimentado con una dieta complementada con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

El **factor estimulador de Natural killer (NKEF)** modula la capacidad citotóxica de las células natural killer (Shau *et al.*, 1993; Bethke *et al.*, 2012). Este gen fue sobreexpresado en todos los tratamientos, especialmente cuando los peces recibieron el probiótico mediante baño a día 3 y en los tres tratamientos por igual a día 28. Se ha demostrado que son moléculas efectoras tanto en respuesta inmune innata y adaptativa al activar la respuesta inflamatoria. Aunque existen estudios sobre la transcripción de los genes **NKEF** cuando se inocularon probióticos en humanos, todavía son escasos los estudios sobre la relación entre la administración de probióticos y los niveles de expresión del gen NKEF. Por ejemplo, Tapia-Paniagua *et al.* (2015) y Cordero *et al.* (2016) relacionaron en sendos estudios con peces (lenguado senegalés y dorada, respectivamente) el aumento en la expresión del gen NKEF con la administración de el probiótico *S. putrefaciens* PDP11. También existen estudios relacionados con la expresión del gen NKEF en peces como el rodaballo (Chen *et al.*, 2006), carpa (*C. carpio*) (Huang, R. *et al.*, 2009), pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Li y Waldbieser, 2006), trucha (Cuesta y Tafalla, 2009; Ordás *et al.*, 2011) y otros peces (Zhang, B.C. *et al.*, 2014; Wang, L. *et al.*, 2015).

Al tercer día de la administración del probiótico se observó un aumento de la transcripción de la **interleucina 10 (IL-10)** en todos los tratamientos. Este resultado es coincidente con los obtenidos en otros estudios en los que se observaron un aumento de la transcripción de IL-10 tras la administración de las probióticas *L. plantarum*, *L. lactis* y *Leuconostoc mesenteroides* en trucha arcoíris (*O. mykiss*) (Pérez-Sánchez *et al.*, 2011); *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* en *Takifugu rubripes* (Biswas *et al.*, 2013); *Pseudomonas aeruginosa* en carpa (*L. rohita*) (Giri *et al.*, 2016); *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. y *Lactobacillus* spp en *O.niloticus* (Standen *et al.*, 2016). La IL-10 es producida por monocitos, células T, células B, natural killer, macrófagos y células dendríticas (Deniz *et al.*, 2008), y posee un efecto inmunosupresor

al inhibir la inflamación debida al patógeno por la disminución de la proporción de células presentadoras de antígenos (Akdis y Blaser, 2001). Esto podría ser indicativo de un mecanismo de tolerancia que posee el individuo con el probiótico.

La **NADPH oxidasa** es la responsable de iniciar la producción de especies reactivas de oxígeno cuando comienza el proceso de infección (Muñoz *et al.*, 2000; Bedard y Krause, 2007). En nuestro estudio existió sobreexpresión de la transcripción del gen que codifica para esta proteína en todos los tratamientos, excepto cuando el pez recibió el probiótico en el baño a los 28 días. Esta sobreexpresión puede ser debida a la estimulación de *V. proteolyticus* **DFC12.2** en el pez, tal como se demostró al administrar el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 en lenguado senegalés (Vidal *et al.*, 2016). La disminución de la transcripción cuando se administró el probiótico en el baño a los 28 días, supone una disminución del aporte de especies reactivas de oxígeno y por tanto una disminución del estrés oxidativo.

El **sequestosoma** media en la producción de citoquinas inflamatorias por parte de los macrófagos (Yu *et al.*, 2009) y por tanto modula la eliminación de patógenos (Zheng *et al.*, 2009), además de activar la autofagia de componentes celulares dañados (Yang *et al.*, 2016). El gen **SQSTM** se sobreexpresó sólo a día 3 cuando el probiótico se administró en el baño. Aunque no existen demasiadas investigaciones sobre la relación entre probióticos y la expresión del gen **SQSTM**, existen estudios celulares que demuestran que la autofagia mediada por bacterias del género *Bifidobacteria* favorece el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Han *et al.*, 2016), e incluso la autofagia que induce el probiótico *Bacillus amyloliquefaciens* es la responsable de prevenir determinadas infecciones bacterianas en el intestino humano (Wu *et al.*, 2017).

Análisis de la microbiota de lenguados tratados con *V. proteolyticus* DCF12.2

El estudio de la DGGE fue usado en esta tesis para evaluar el efecto del probiótico en la estructura de la comunidad microbiana en el mucus intestinal y de la piel, ya que los cambios en los patrones de las bandas pueden indicar cambios ecológicos en las comunidades bacterianas (Montet *et al.*, 2012; Larsen *et al.*, 2014).

La microbiota intestinal del pez está relacionada con la digestión, el crecimiento, la reproducción y la mejora de la salud del pez (Ganguly *et al.*, 2012; Ray *et al.*, 2012;

Llewellyn *et al.*, 2014; Ghanbari *et al.*, 2015; Montalban-Arqueset *et al.*, 2015). El intestino es también una barrera importante contra los patógenos oportunistas (Peterson y Atis, 2014), como se ha demostrado frente a bacterias como *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Streptococcus iniae* (Merrifield *et al.*, 2010a; Nayak, 2010) Lazado y Caipang (2014) comprobaron que ciertas bacterias probióticas pueden alterar la composición de la microbiota intestinal, inhibiendo la población de patógenos, colonizando la superficie de la mucosa y coexistiendo con la microbiota intestinal. Se ha observado que la adición de probióticos a través del alimento puede inducir el aumento de la proporción de especies beneficiosas en el tracto intestinal del lenguado senegalés (Tapia-Paniagua *et al.*, 2010). Además, los probióticos pueden mejorar funciones como la digestión (Ray *et al.*, 2012), la respuesta inmune (Nayak 2010; Gaggia *et al.*, 2010; Merrifield *et al.*, 2010a; Iwashita *et al.*, 2015) y la integridad de las células intestinales (Rawls *et al.*, 2004; Bates *et al.*, 2006; Daniels *et al.*, 2010).

Los microorganismos del agua también pueden afectar en la microbiota intestinal (Wang *et al.*, 1993; Navarrete *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2012). Navarrete *et al.* (2009) afirmaron que las bacterias del género *Pseudomonas* presentes en los individuos juveniles de salmón atlántico provenían del agua de cultivo. Según Wu *et al.* (2012), la composición de la microbiota intestinal de la carpa china (*Ctenopharyngodon idellus*) se asemeja al agua y el sedimento del cultivo. La temperatura del agua (Hovda *et al.*, 2012; Zarkasi *et al.*, 2014; Neuman *et al.*, 2016) y la salinidad son los dos principales parámetros en el agua que pueden afectar a la microbiota intestinal. Hovda *et al.* (2012), Zarkasi *et al.* (2014) y Neuman *et al.* (2016) detectaron variaciones en la microbiota intestinal del salmón atlántico debido al efecto de la temperatura. Otro factor ambiental que puede influenciar en la composición de la microbiota intestinal es el estrés (Olsen *et al.*, 2002).

La bacteria *V. proteolyticus* **DCF12.2** no se detectó como una de las bandas predominantes en las muestras intestinales. Una de las causas podría ser que el probiótico no se estableciera en el lumen del pez, aunque la ausencia de bandas no excluye la presencia de los probióticos administrados, ya que el límite de detección de la técnica de la DGGE se encuentra en un 1 % del total de la población (Fromin *et al.*, 2002).

La mayor parte de la microbiota secuenciada a partir del ribosómico 16S del mucus intestinal y de la piel, está relacionada con la clase bacteriana

GammaProteobacteria. Esta clase bacteriana es el grupo más importante que se localiza en especies de peces planos como el lenguado *Solea senegalensis* (Martin-Antonio *et al.*, 2007; Tapia-Paniagua *et al.*, 2014, 2015), *Paralichthys olivaceus* (Sugita e Ito, 2006) y *Paralichthys dentatus* (Eddy y Jones, 2002). En este estudio se ha visto que diferentes especies del género *Vibrio* han sido los predominantes en la microbiota intestinal. *Vibrio parahaemolyticus* se encuentra de manera generalizada en el medio ambiente (Wong *et al.*, 1999), y se ha identificado en lenguados (Lobo *et al.*, 2014; Tapia-Paniagua *et al.*, 2014). *Vibrio scophthalmi* es una bacteria muy cercana filogenéticamente con *Vibrio ichthyenteri*, una bacteria frecuente en peces planos tanto en *S. senegalensis* (Tapia-Paniagua *et al.*, 2014, 2015) como en el rodaballo (Cerdà-Cuellar y Blanch 2002) o *Paralichthys olivaceus* (Sugita e Ito, 2006). El resto de especies secuenciadas se encuentran en el medio natural o de manera comensal en peces (Gómez-Gil *et al.*, 2003; Chiu *et al.*, 2007; Carson *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2012; Albuquerque-Costa *et al.*, 2013; Givens *et al.*, 2014; Tapia-Paniagua, 2014). Por ejemplo, *Candidatus Arthromitus* es una bacteria filamentosa que se encuentra ampliamente distribuida en el intestino de muchos animales (Huber *et al.*, 2004; Cecchini *et al.*, 2012) y se ha podido comprobar su presencia en lenguados a los que se les suministró un probiótico (Tapia-Paniagua, 2014).

La microbiota intestinal cambia tras 14 días de alimentar a los peces con el probiótico. Sin embargo este agrupamiento fue solo del 35 %, por lo que no se puede considerar que el cambio haya sido importante. Tras 28 días de alimentación con el probiótico no se observaron diferencias de la microbiota con los controles. Sin embargo en otras investigaciones se han encontrado cambios más acentuados en la microbiota de los peces tras la administración de un probiótico, como en el caso del mero, *E. coioides* (Sun, Y. Z. *et al.*, 2012), tilapia (*O. niloticus*) (Ferguson *et al.*, 2010) y la carpa (*L. rohita*) (Nayak *et al.*, 2007).

En los peces alimentados con la mezcla de pienso y *V. proteolyticus* **DCF12.2** se aumentó la diversidad de la microbiota intestinal de manera significativa comparada con el grupo control. Esto sugiere la influencia de la adición del probiótico en la dieta. Una comunidad microbiana diversa puede adaptarse a cambios bruscos, favoreciendo a que en caso fluctuaciones la comunidad pueda adaptarse y unos microorganismos sustituyan la función que tenían otros (Marzorati *et al.*, 2008). Por otra parte, una diversidad baja puede conducir a enfermedades, tal como comprobaron Grisez *et al.* (1997) cuando

evidenciaron dicha relación en dorada y lubina, con una alta dominancia de *Vibrio anguillarum* en la microbiota intestinal. Se han informado de cambios al suministrar probióticos tales como *S. putrefaciens* PDP11 y *Shewanella báltica* PDP13 a lenguados juveniles y a larvas (García de la Banda *et al.*, 2010). A pesar del aumento de la diversidad microbiana conseguida con el probiótico, esta no fue demasiado alta. La administración de un probiótico no siempre supone un aumento de la diversidad, pudiendo el probiótico favorecer una comunidad simple y poco diversa (Gisbert *et al.*, 2013). En estudios relacionados con la microbiota intestinal del lenguado senegalés, Tapia-Paniagua (2010) no observaron la presencia de diferencias significativas de riqueza específica y diversidad entre lenguado senegalés alimentado con *S. putrefaciens* y peces controles, aunque sí concluyeron una diversidad menor entre larvas de lenguado senegalés alimentadas con *S. putrefaciens* Tapia-Paniagua *et al.*, 2014). El estudio de la administración antibiótico oxitetraciclina y del probiótico *S. putrefaciens* (Tapia-Paniagua *et al.*, 2015) evidenció una disminución significativa de la riqueza y de la diversidad en la microbiota intestinal del lenguado, y un aumento de la riqueza y la diversidad cuando el antibiótico y el probiótico se suministraron de manera conjunta al lenguado.

Los tratamientos en los que el probiótico se administró en la dieta a día 14, manifestaron una habitabilidad significativa elevada (Marzorati *et al.*, 2008), aunque los valores presentaron una elevada desviación típica. Esta habitabilidad elevada supone que el sistema puede soportar una comunidad microbiana variada y diversa filogenéticamente (De Schryver *et al.*, 2010; Yeung *et al.*, 2011), lo que haría al pez más resistente ante fluctuaciones en las condiciones de cultivo.

Respecto a la microbiota de la piel de peces inoculados por baño tampoco se observaron diferencias. La ausencia de modificación en la microbiota tras la administración de un probiótico también ha sido descrita por Sun *et al.*, (2011), y Yang *et al.*, (2012). Estos autores observaron que los probióticos *Bacillus pumilus* y *Bacillus clausii* administrados por vía oral no ejercieron ningún efecto significativo sobre la microbiota intestinal de *E. coioides*.

Ensayos de protección

Mediante un *challenge* o infección experimental, se puede conocer la protección que confiere de la administración de un probiótico frente a un determinado patógeno. La infección experimental se realizó por vía intraperitoneal porque es la ruta que se suele usar para evaluar diferentes estrategias de protección (Acosta *et al.*, 2005; Arijo *et al.*, 2005b; Lin *et al.*, 2006) debido a que se inyecta una cantidad conocida de antígenos (Nakanishi *et al.*, 2002).

La infección experimental con *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 produjo la mortalidad del 100 % de los controles, generando una protección (RPS) del 30 % cuando la cepa *V. proteolyticus* **DCF12.2** se administró por vía intraperitoneal o mediante el pienso, y una protección del 40 % cuando se administró por baño. Los datos de RPS que se obtuvieron al administrar el probiótico en el baño son similares a los obtenidos por Arijo *et al.* (2005b) en los que se obtuvo un nivel de protección entre el 38 % y el 44 % mediante inmersión prolongada con la bacterina de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01. El valor de RPS que se obtuvo en la administración oral del probiótico fue similar al obtenido por García de la Banda *et al.*, (2012), quienes informaron de valores de RPS del 25 al 43,8 % frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 cuando administraron el probiótico *S. putrefaciens* PDP11 por vía oral en lenguado. Por otra parte, fue superior al RPS obtenido por Díaz-Rosales *et al.*, (2009) al administrar oralmente el probiótico *S. baltica* PDP13 en el lenguado (entre el 20 % y el 35 %).

El tratamiento que ofreció mayor protección frente el patógeno *V. harveyi* Lg16.00 fue la inyección intraperitoneal del probiótico. En este caso puede existir una correlación entre el nivel de anticuerpos del suero en el tratamiento intraperitoneal y la protección frente al patógeno en la infección experimental. Así mismo, la vía intraperitoneal suele dar una mejor protección que mediante baño, porque supone una entrada directa de antígenos y su correspondiente transporte a los órganos linfoides (Nakanishi *et al.*, 2002; Plant y LaPatra, 2011). Sin embargo la inyección intraperitoneal no es la vía normal de administración de un probiótico, por lo que esta prueba se realizó como vía para forzar que el pez generase una respuesta inmunitaria, consistente fundamentalmente en la producción de anticuerpos que protegieran frente a los patógenos.

La administración del probiótico mediante baño o a través de la dieta no produjo ningún tipo de protección frente a *V. harveyi*. El baño es la vía de administración de probióticos que suele realizarse con mayor frecuencia frente *V. harveyi* (Ravi *et al.*, 2007; Zokaeifar *et al.*, 2014), aunque también se usa la vía oral (Hao *et al.*, 2014; Liu, H. *et al.*, 2014). Respecto a la administración del probiótico en el pez por vía oral puede producirse una degradación de los antígenos debido a las enzimas proteolíticas del sistema digestivo, por lo que sería necesario incrementar la dosis del probiótico o encapsularlo para que ocurra una respuesta inmune satisfactoria (Mao *et al.*, 2011; Harikrishnan *et al.*, 2012). Aunque existen ensayos que prueban la efectividad de la vía oral para la administración de probióticos en lenguados frente *V. harveyi* (Chabrillón *et al.*, 2005), todavía son escasos los estudios de probióticos frente *V. harveyi* Lg16.00 en lenguados.

4. Empleo combinado de la cepa *Vibrio proteolyticus* DCF12.2 y de una vacuna bivalente frente *P. damselae* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*

El objetivo de este capítulo fue determinar si la cepa *V. proteolyticus* **DCF12.2** tenía un efecto potenciador sobre la respuesta humoral de lenguados inmunizados con una vacuna bivalente por baño. Para determinar si existió un cambio en la microbiota de la piel debido a la producción de anticuerpos secretores se realizó un estudio mediante DGGE. Finalmente se evaluó mediante un ensayo de supervivencia si el uso combinado de la cepa *V. proteolyticus* **DCF12.2** y una vacuna bivalente aumentaban el grado de protección generado por la vacuna frente a las bacterias patógenas.

Determinación de anticuerpos en el suero y mucus de los peces

Al ensayar el posible efecto aditivo entre el probiótico y una vacuna bivalente únicamente existió un aumento en el título de anticuerpos en el suero de peces a los que se les administró el probiótico pero no recibieron la vacuna. Esto podría indicar que existe un efecto antagonista entre probiótico y vacuna, posiblemente por la unión de los probióticos con los anticuerpos producidos por la vacuna, con lo que el título de anticuerpos bajaría. Existen algunos estudios en humanos que indican un aumento de anticuerpos relacionados con una vacuna tras la administración de un probiótico

mediante administración oral. Algunos de estos de estos estudios son los de Paineau *et al.*, (2008) con bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* frente *V. cholerae*, Davidson *et al.* (2011) con *Lactobacillus rhamnosus* frente el virus de la gripe; Rizzardini *et al.* (2012) con *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* y *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* frente al virus de la gripe; y Maidens *et al.* (2013) con una cepa de *Bifidobacterium breve* administrada en individuos inmunizados con *V. cholerae*.

Aunque en el suero de los peces vacunados no se observaron anticuerpos específicos, sí se observaron en el mucus de la piel de peces vacunados a los 15 días. Esto indica que la respuesta inmunitaria se ha dado a nivel local, en la misma piel, ya que es en esta zona donde se ha tenido contacto con el antígeno (Xu, Z. *et al.*, 2009; Esteban *et al.*, 2012; Song-Lin *et al.*, 2014). Puede también explicar por qué se ve una protección tan baja tras las infecciones experimentales, ya que estas se hicieron por vía intraperitoneal mientras que la producción de anticuerpos se generó fundamentalmente en la superficie de los peces.

Análisis de la microbiota de la piel

Se observó una variación de la microbiota de la piel de los lenguados producida por la vacunación, originando cambios en los patrones de bandas de DGGE con respecto a los peces controles. Este cambio podría estar condicionado por la producción de anticuerpos secretores que se unirían específicamente a determinadas bacterias, generando como consecuencia una modificación de la microbiota. Existen pocos estudios en peces sobre el efecto de una vacunación en la composición de la microbiota. Liu *et al.* (2008) y Liu *et al.* (2015) observaron cambios de la microbiota del salmón y la carpa (*Ctenopharyngodon idella*) al inyectarles *A. salmonicida* ssp. *salmonicida* de manera intraperitoneal o *Aeromonas hydrophila* mediante baño. Recientemente también se ha descrito en humanos la interacción que podrían poseer las inmunoglobulinas con la microbiota (Sutherland *et al.*, 2016).

Sin embargo la administración de la cepa **DCF12.2** parece no haber intervenido en la modificación de la microbiota, tal como ya se observó en el **capítulo 3**.

Ensayo de protección

Respecto a las infecciones experimentales con *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01, parece existir un efecto aditivo del probiótico con la vacuna, ya que el RPS es la suma de los RPS de los peces vacunados y los peces que recibieron el probiótico por separado. Este efecto aditivo del probiótico en la vacunación se encuentra recogido en otros trabajos (Ramesh *et al.*, 2015; Giri *et al.*, 2016; Matsuura *et al.*, 2017).

El bajo porcentaje de supervivencia en los peces que recibieron el probiótico por baño pudo ser debido a que únicamente se inmunizaron los peces una sola vez. La inmunización mediante esta vía no permite un título significativo de anticuerpos sistémicos si no existe una dosis adicional del inmunógeno (Romalde *et al.*, 2002). Por otra parte el tamaño de los peces (entre 35 y 40 g), por su menor relación superficie-volumen respecto a los alevines, puede impedir una correcta difusión de la vacuna a través de la piel, lo que dificultaría la activación del sistema inmune. Se han descrito casos en los que la administración por baño solo es útil en peces de menor tamaño, dejando de ser efectiva para peces mayores (Magariños 1994a). Por otra parte, para que el probiótico tenga incidencia sobre la respuesta inmune, sería necesario que permaneciera durante un tiempo en la piel colonizándola (Pérez-Sánchez *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015). Sin embargo la cepa **DCF12.2** no se ha podido detectar en los análisis de microbiota, por lo que cabe la posibilidad de que la bacteria no se haya adherido a la superficie del pez el tiempo suficiente para conseguir la activación del sistema inmunitario.

En el caso de los peces infectados con *V. harveyi* Lg16.00, no se observó un efecto aditivo de protección entre el probiótico y la vacuna. Este efecto también fue descrito por Xing *et al.* (2013), observando un incremento de la supervivencia de cobias (*Rachycentron canadum*) vacunadas y alimentadas con un probiótico (*Pediococcus pentosaceus*), a pesar de que el tratamiento no aumentó la respuesta inmune específica.

Los títulos de anticuerpos detectados en los peces del capítulo 3 (ausencia de diferencias entre el título de anticuerpos que recibieron el probiótico por baño respecto a los controles) no se correspondieron con los observados en el capítulo 4. De igual manera, la protección que confirió la cepa tras las infecciones experimentales fueron diferentes en los ensayos del capítulo 3 y el 4. La diferencia que existió entre el RPS de la administración del probiótico mediante baño en el tercer capítulo (40 % de frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01, 17 % frente a *V. harveyi* Lg16.00) y el RPS del

tratamiento probiótico en el cuarto capítulo (10 % frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01, 50 % frente a *V. harveyi* Lg16.00) pudo ser debida a que las condiciones de temperatura y mantenimiento en el cultivo de los peces fueron diferentes en ambas condicione. Así la evaluación de la protección de un probiótico mediante diferentes vías se realizó entre los meses de diciembre y marzo con una temperatura $16,5 \pm 3,5$ °C. Sin embargo, el ensayo en el que se probó el efecto del probiótico en una vacuna bivalente, se realizó entre julio y agosto con una temperatura media de 30 °C. Diferentes factores ambientales tanto internos (peso, condiciones de salud...) como externos (temperatura y salinidad del agua, fotoperiodo, estación del año, densidad de peces en el cultivo...) pueden afectar tanto al estado inmunológico del pez, a la eficacia de la inmunización mediante diferentes vías y a otras funciones fisiológicas como el crecimiento o la reproducción (Panigrahi *et al.*, 2007; Raida y Buchmann, 2008; Costas *et al.*, 2011; Xu, G. *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2012; Stevens *et al.*, 2017). Raida y Buchmann (2008) demostraron la importancia de la temperatura del agua cuando se inmunizaron ejemplares de trucha arcoíris. Además, Soto *et al.* (2014) relacionaron el efecto de la temperatura y el tamaño de los peces en la eficiencia de la vacunación de especímenes de tilapia.

Resumen de la discusión y perspectivas futuras

En el presente trabajo se han identificado los antígenos más reactivos de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41,01 y *V. harveyi* Lg16.00 mediante la electroforesis bidimensional (**Capítulo 1**), a la vez que se han seleccionado y caracterizado algunas cepas con antígenos comunes frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *Vibrio harveyi* Lg16.00 (**Capítulo 2**). Con la cepa seleccionada **DCF12.2** de *V. proteolyticus* se realizaron ensayos *in vivo* (**Capítulo 3**), determinando la expresión génica de diversos genes relacionados con el estrés y la inmunidad, la protección frente a los patógenos, el título de anticuerpos en diferentes tejidos y la diversidad microbiana en el intestino y la piel. Por último se ha aportado información sobre el uso combinado del probiótico junto a una vacuna bivalente administrada por baño (**Capítulo 4**).

Se realizó una selección a partir de 718 cepas bacterianas procedentes de peces sanos en base a su capacidad de dar reacción cruzada con los antiseros de los peces inmunizados con los patógenos *P.damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00. Se seleccionaron 138 cepas, a las que se estudió su capacidad antagonista sobre el crecimiento de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00. De estos estudios se detectaron 7 cepas que inhibían el crecimiento de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01, 7 cepas que inhibían el crecimiento de *V. harveyi* Lg16.00 y 2 cepas que inhibían el crecimiento de ambos patógenos. Finalmente se comprobó mediante *Western blot* que cinco de ellas poseían antígenos que dieron reacciones cruzadas frente a ambos patógenos. Las bacterias se identificaron como *Vibrio sp*, *Vibrio proteolyticus* y *Vibrio alginolyticus*.

Se demostró la inocuidad de estas cepas para los lenguados y su capacidad para generar reacciones cruzada frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01y *V. harveyi* Lg16.00. Esta última característica es interesante ya que plantea el uso de estos microorganismos como una posible vacuna viva para aplicar a los peces frente a los patógenos estudiados.

De acuerdo las características analizadas, las cepas seleccionadas son propuestas como posibles probióticos ya que son capaces de inhibir *in vitro* a los patógenos, inocuas para el lenguado; capaces de inducir reacción cruzada frente *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00; viables en refrigeración (4 °C); útiles para su

administración por bajo y por pienso en baño; resistentes la acción de la bilis y pH del sistema digestivo del pez; y sensibles a la mayoría de antimicrobianos.

Finalmente se seleccionó por *V. proteolyticus* **DCF12.2** para estudiar su efecto sobre el sistema inmune innato y adaptativo del lenguado por presentar la cepa **DCF12.2** una serie de características favorables: no ser patógena en lenguados, ser sensible a un amplio espectro de antibióticos, ser resistente a la acción de sales biliares y a un pH ácido, poseer capacidad antagónica frente *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg 41.01 y *V. harveyi* Lg16.00 y, fundamentalmente, por presentar antígenos comunes con estos dos patógenos.

Se administró *V. proteolyticus* **DCF12.2** a los peces por baño, en el pienso y por vía intraperitoneal. Los resultados mostraron que esta cepa protegió frente *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 cuando se administró el probiótico por baño, mediante el pienso y por vía intraperitoneal. Además, *V. proteolyticus* **DCF12.2** ofreció protección frente *V. harveyi* Lg16.00 cuando se administró el probiótico por vía intraperitoneal. Esta protección se correlacionó con la existencia de anticuerpos tanto en el suero como en la mucosa intestinal.

Por otra parte, el análisis de la expresión de los genes relacionados con la inmunidad mostró que la *V. proteolyticus* **DCF12.2** moduló la respuesta inmunitaria humoral, celular y de genes relacionados con el estrés, siendo el gen NKEF (factor estimulador de *Natural killer*) el que experimentó un mayor incremento.

Finalmente se estudió la eficacia de un tratamiento combinado por *V. proteolyticus* **DCF12.2** administrada por baño y una vacuna bivalente frente *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 y *V. harveyi* Lg16.00.

La mayor protección frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* se obtuvo por el uso combinado del probiótico y de la vacuna, mientras que no hubo efecto en peces infectados con *V. harveyi* Lg16.00.

De los datos obtenidos tanto del **capítulo 3** como del **capítulo 4** se observa que la cepa **DCF12.2** proporciona un cierto grado de protección frente a los patógenos utilizados. Esta protección podría estar relacionada con la capacidad de *Vibrio proteolyticus* **DCF12.2** de inhibir el crecimiento de los patógenos *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. harveyi*, inducir anticuerpos con reacción cruzada frente a los patógenos, y de incrementar la transcripción de genes del sistema inmune innato.

En base a esto la cepa **DFC12.2** de *V. proteolyticus* ha demostrado potencialidad como probiótico con capacidad de proteger y estimular la respuesta inmunitaria de lenguado, tanto específica como inespecífica. Sin embargo todavía no se ha podido demostrar una relación causa-efecto entre la existencia de antígenos comunes con los patógenos y la protección que confiere a los peces, por lo que serán necesarios estudios posteriores en esta vía.

Este trabajo abre expectativas para el posterior uso de la cepa **DFC12.2** de *V. proteolyticus* en acuicultura. Sin embargo, la Unión Europea aplica una normativa estricta en la evaluación de los probióticos para su posterior comercialización, ya que se deben proporcionar evidencias de la seguridad y eficacia del producto. Muchos de estos ensayos han sido desarrollados a lo largo de esta tesis. La caracterización y evaluación *in vitro* (inhibición de los patógenos, inocuidad en el pez objetivo, resistencia...) como *in vivo* para comprobar que existe un beneficio en el pez (De Azevedo y Braga, 2012) son algunos de los estudios que se deben seguir en la Unión Europea para el registro de complementos en piensos (Reglamento (CE) nº 1831/2003, Reglamento (CE) nº 429/2008 y diversas directrices para la evaluación de aditivos para piensos) (Von Holst *et al.*, 2016). El registro solo entraría en vigor una vez que la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) hubiera aprobado la eficiencia del probiótico, así como su seguridad en humanos, animales y el medio ambiente. Entre otros estudios que quedan por realizar en este trabajo serían pruebas de genotoxicidad y toxicidad oral en peces para excluir la posibilidad de que cuando el probiótico se acumula en el animal no constituya un riesgo para el consumidor (Anadón *et al.*, 2006).

También haría falta determinar su estabilidad génica y funcional para permitir una producción fiable a gran escala (Busch *et al.*, 2004), ya que algunos estudios han demostrado que la capacidad de los probióticos para producir metabolitos antimicrobianos puede perderse debido al almacenamiento y el subcultivo (Vine *et al.*, 2006).

Además sería necesario conocer si los probióticos son seguros para los trabajadores, y establecer el riesgo ambiental de liberar estos probióticos al medio ambiente (Anadón *et al.*, 2006). Para facilitar su aprobación en el registro podría ser conveniente inactivar las bacterias, disminuyendo de esta manera los problemas sanitarios y los riesgos ambientales asociados con la liberación de organismos vivos. Los probióticos inactivados se pueden añadir fácilmente en piensos que requieran una

temperatura alta durante su fabricación. Al mismo tiempo, no requieren una cadena de almacenamiento en frío y, por lo general, tienen una vida útil más larga (Makinen *et al.*, 2012). En este caso sería necesario evaluar si la bacteria mantiene sus características probióticas cuando se administra inactivado en el pienso.

Por otra parte, sería interesante probar la cepa seleccionada en otros peces. Ya que muchos probióticos no posee ningún tipo de relación específica con su hospedador (Austin *et al.*, 1995; Gildberg y Mikkelsen, 1998; Gram *et al.*, 1999; Irianto y Austin, 2002; Tapia-Paniagua *et al.*, 2012).

Los resultados de este trabajo abren nuevas vías de investigación, como corroborar los resultados obtenidos con la cepa potencialmente probiótica en modelos biológicos más complicados y en estudios con humanos. Una vacuna atenuada proporciona una mejor protección que las vacunas inactivadas, sin embargo pueden surgir algunos problemas como el de reversión a su forma virulenta (Minor, 2015). Sin embargo, esta tesis doctoral ha propuesto como alternativa a las vacunas atenuadas la utilización de probióticos con reacción cruzada, aunque todavía no existen resultados concluyentes al respecto. Esto no significa que se encuentre una solución al problema de las vacunas atenuadas mediante la utilización de probióticos, pero los resultados prometen una contribución importante al desarrollo de estrategias efectivas para la gestión de la salud de los peces una respuesta en un futuro cercano de la salud humana.

CONCLUSIONES



Conclusiones

1. La inmunización de lenguados con *V. harveyi* Lg16.00 activa la producción de anticuerpos que reaccionan fundamentalmente con las proteínas maltoporina, fosfohidrolasa, porina, proteína de división celular FtsH, proteína 3-hidroxibutirato deshidrogenasa y una fosfatasa ácida.
2. Cuando los lenguados se inmunizan con *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01 los anticuerpos reaccionan fundamentalmente con metaloproteasa dependiente de ATP, proteína que confiere resistencia a telurito, nitrito reductasa, proteína antioxidante de la familia Ahp/CTSA y proteína con dominio de unión a ADN relacionada con el choque térmico.
3. Se ha conseguido seleccionar 5 cepas con antígenos comunes frente a *V. harveyi* Lg16.00 y/o *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01. Sin embargo no se encontraron coincidencias entre las proteínas más reactivas observadas en estas cepas y las más reactivas en el caso de las cepas patógenas. A pesar de su semejanza antigénica con los patógenos, estas cepas han demostrado ser inocuas para los lenguados.
4. Las cepas seleccionadas presentan capacidad antagónica frente a los patógenos ensayados. Además son sensibles a los antibióticos más usados en las piscifactorías, permanecen viables en agua de mar y solución salina a diferentes temperaturas, y sobreviven a la liofilización, a un pH bajo y a altas concentraciones de bilis. Todas estas características hacen que puedan ser consideradas como cepas probióticas.
5. De las cepas seleccionadas *Vibrio proteolyticus* **DCF12.2** es la más idónea para su potencial uso como probiótico, por su capacidad de inhibir tanto a *V. harveyi* Lg16.00 como a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01, y producir reacciones cruzadas frente a los dos patógenos.
6. La cepa *Vibrio proteolyticus* **DCF12.2** posee capacidad inmunoestimuladora, ya que administrada a los lenguados activó la producción de anticuerpos y aumentó la expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario, expresando de manera predominante el gen NKEF (factor potenciador de las “Natural killer”).

7. La cepa *Vibrio proteolyticus* **DCF12.2** posee la capacidad de proteger a los lenguados frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* en todas las condiciones ensayadas, mientras que solo ha mostrado capacidad protectora frente a *V. harveyi* cuando la cepa DCF12.2 es administrada por vía intraperitoneal
8. La cepa *Vibrio proteolyticus* **DCF12.2** administrada junto a una vacuna bivalente genera un efecto aditivo en la protección frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01, sin embargo este efecto aditivo no se observó frente a *V. harveyi* Lg16.00.

BIBLIOGRAFÍA



A

- Abbass, A., Sharifuzzaman, S. M., & Austin, B. (2010). Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 33, 31-37.
- Abdelhamid, A. M., Mehrim, A. I., El-Barbary, M. I., Ibrahim, S. M., & El-Wahab, A. A. (2009). Evaluation of a New Egyptian Probiotic by African Catfish Fingerlings. *Journal of Environmental Science and Technology*, 2, 133-145.
- Abdel-Rhman, A. M. A., Khattab, Y. A., & Shalaby, A. M. (2009). *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27, 175-180
- Abelli, L., Randelli, E., Carnevali, O., & Picchiatti, S. (2009). Stimulation of gut immune system by early administration of probiotic strains in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1163, 340-342.
- Abu-Elala, N., Marzouk, M., & Moustafa, M. (2013). Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 1 (1), 21-29.
- Acosta, F., Real, F., Ellis, A. E., Tabraue, C., Padilla, D., & de Galarreta, C. R. (2005). Influence of vaccination on the nitric oxide response of gilthead seabream following infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 18, 31-38.
- Acosta, F., Ellis, A. E., Vivas, J., Padilla, D., Acosta, B., Deniz, S., ... & Real, F. (2006). Complement consumption by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in seabream, red porgy and seabass normal and immune serum. Effect of the capsule on the bactericidal effect. *Fish & Shellfish Immunology*, 20 (5), 709-717.
- Acosta, F., Vivas, J., Padilla, D., Vega, J., Bravo, J., Grasso, V., ... & Real, F. (2009). Invasion and survival of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in non-phagocytic cells of gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Journal of Fish Diseases*, 32, 535-541.
- Adams, M. (1999). Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 68 (2), 171-178.
- Addo, S., Carrias, A. A., Williams, M. A., Liles, M. R., Terhune, J. S., & Davis, D. A. (2017). Effects of *Bacillus subtilis* strains on growth, immune parameters, and *Streptococcus iniae* susceptibility in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 48(2), 257-267.
- Afonso, A., Gomes, S., Da Silva, J., Marques, F., & Henrique, M. (2005). Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 19, 1-16.
- Akdis, C. A., & Blaser, K. (2001). Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology*, 103(2), 131-136.
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., & Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology*, 45, 733-741.
- Akinbowale, O. L., Peng, H., & Barton, M. D. (2006). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1103-1113.
- Al-Dohail, M. A., Hashim, R., & Aliyu-Paiko, M. (2009). Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. *Aquaculture Research*, 40 (14), 1642-1652.

- Alabi, A. O., Jones, D. A., & Latchford, J. W. (1999). The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 178, 1-11.
- Alavandi, S. V., Manoranjita, V., Vijayan, K. K., Kalaimani, N., & Santiago, T. C. (2006). Phenotypic and molecular typing of *Vibrio harveyi* isolates and their pathogenicity to tiger shrimp larvae. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 566-570.
- Albuquerque-Costa, R., Lima-Araújo, R., & Silva dos Fernandes-Vieira, R. H. (2013). Fenotipado de cepas de *Vibrio* aisladas de la hemolinfa de camarones marinos. *Ciencias marinas*, 39 (3), 317-321.
- Allsopp, M., Johnston, P., & Santillo, D. (2008). *Challenging the aquaculture industry on sustainability*. 2nd Edition. Netherlands: Greenpeace International.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215 (3), 403-410.
- Aly, S. M., Ahmed, Y. A. G., Ghareeb, A. A. A., & Mohamed, M. F. (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 128-136.
- Ambas, I., Buller, N., & Fotedar, R. (2015). Isolation and screening of probiotic candidates from marron, *Cherax cainii* (Austin, 2002) gastrointestinal tract (GIT) and commercial probiotic products for the use in marron culture. *Journal of Fish Diseases*, 38(5), 467-476.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., & Martínez, M. A. (2006). Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45, 91-95.
- Anderson, A. (2013). The effect of the probiotic *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota ecology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) analysed using DGGE. *The Plymouth Student Scientist*, 6 (1), 86-103.
- Andreoni, F., Boiani, R., Serafini, G., Amagliani, G., Dominici, S., Riccioni, G., ... & Magnani, M. (2013). Isolation of a novel gene from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and analysis of the recombinant antigen as promising vaccine candidate. *Vaccine*, 31 (5), 820-826.
- Andreoni, F., & Magnani, M. (2014). Photobacteriosis: prevention and diagnosis. *Journal of Immunology Research*, 2014.
- Anguis, V., & Canavate, J. P. (2005). Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture*, 243 (1), 133-145.
- Arevik, I., Kristina, K., Flora, T., Lilya, A., & Tsovinar, B. (2015). Sensitivity of different pathogens to biological antimicrobial agents. *European journal of Biomedical and Life Sciences*, 3, 61-66.
- Ariğ, N., Süzer, C., Gökvardar, A., Başaran, F., Çoban, D., Yıldırım, Ş., ... & Saka, Ş. (2013). Effects of probiotic (*Bacillus* sp.) supplementation during larval development of Gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13 (3).
- Arihara, K., Ota, H., Itoh, M., Kondo, Y., Sameshima, T., Yamanaka, H., ... & Miki, T. (1998). *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. *Journal of Food Science*, 63(3), 544-547.
- Arijo S., Chabrillón M., Díaz-Rosales P., Rico R., Martínez-Manzanares E., Balebona M.C., Toranzo A.E., ... & Moriñigo M.A. (2005a). Bacteria isolated from outbreaks affecting cultured sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*, 25, 148-154.
- Arijo, S., Rico, R., Chabrillón, M., Díaz-Rosales, P., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M., ... & Moriñigo, M. A. (2005b). Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, 28, 33-38.

- Arijo, S., Brunt, J., Chabrilón, M., Díaz-Rosales, P., & 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
- Armada, S. P., Farto, R., Pérez, M. J., & Nieto, T. P. (2003). Effect of temperature, salinity and nutrient content on the survival responses of *Vibrio splendidus* biotype I. *Microbiology*, 149 (2), 369-375.
- Ashley, P. J. (2007). Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104 (3), 199-235.
- Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos [Internet]. La acuicultura en España, 2016. Recuperado el 1 de julio de 2017 de http://www.observatorio-acuicultura.es/sites/default/files/images/adjuntos/libros/acuicultura_en_esp2016.pdf
- Aubin, J., Gatesoupe, F. J., Labbé, L., & Lebrun, L. (2005). Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*, 36, 758-767.
- Aunsmo, A., Larssen, R. B., Valle, P. S., Sandberg, M., Evensen, Ø., Midtlyng, P. J., & Skjerve, E. (2008). Improved field trial methodology for quantifying vaccination side-effects in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 284, 19-24.
- Austin, B., Stuckey, L. 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(1), 93-96.
- Austin, B., & Zhang, X. H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in applied microbiology*, 43, 119-124.
- Avella, M. A., Gioacchini, G., Decamp, O., Makridis, P., Bracciatelli, C., & Carnevali, O. (2010). Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture. *Aquaculture*, 305 (1), 12-19.
- Avella, M. A., Olivotto, I., Silvi, S., Ribeco, C., Cresci, A., Palermo, F., ... & Carnevali, O. (2011). Use of *Enterococcus faecium* to improve common sole (*Solea solea*) larviculture. *Aquaculture*, 315, 384-393.

B

- Babiuk, L. A., Babiuk, S. L., & Loehr, B. I. (2000). Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 76, 1-23.
- Baffone, W., Citterio, B., Vittoria, E., Casaroli, A., Pianetti, A., Campana, R., ... & Bruscolini, F. (2001). Determination of several potential virulence factors in *Vibrio spp.* isolated from sea water. *Food Microbiology*, 18, 479-488.
- Bairagi, A., Ghosh, K. S., Sen, S. K., & Ray, A. K. (2002). Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*, 10, 109-121.
- Bakopoulos, V., Peric, Z., Rodger, H., Adams, A., & Richards, R. (1997). First report of fish pasteurellosis from Malta. *Journal of Aquatic Animal Health*, 9, 26-33
- Bakopoulos, V., Volpatti, D., Gusmani, L., Galeotti, M., Adams, A., & Dimitriadis, G. J. (2003). Vaccination trials of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, using novel vaccine mixtures. *Journal of Fish Diseases*, 26, 77-90.
- Bakopoulos, V., Hanif, A., Poulos, K., Galeotti, M., Adams, A., & Dimitriadis, G. J. (2004). The effect of in vivo growth on the cellular and extracellular components of the marine bacterial pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of fish diseases*, 27(1), 1-13.

- Balcázar, J. L. (2003). Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. Final Report. *National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador*.
- Balcazar, J. L., Vendrell, D., Blas de, I., Ruiz-Zarzuela, I., & Muzquiz, J. L. (2004). Probiotics: a tool for the future of fish and shellfish health management. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 19, 239-242.
- Balcázar, J. L., Blas de, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Calvo, A. C., Márquez, I., ... & Muzquiz, J. L. (2007a). Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition*, 97, 522-527.
- Balcázar, J. L., Rojas-Luna, T., & Cunningham, D. P. (2007b). Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96 (2), 147-150.
- Balcázar, J. L., Vendrell, D., Blas de, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J. L., & Girones, O. (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 278, 188-191
- Balcázar, J. L., Vendrell, D. L., Blas de, I., Ruiz-Zarzuela, I., & Muzquiz, J. L. (2009). Effect of *Lactococcus lactis* CLFP 100 and *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 on *Aeromonas salmonicida* infection in brown trout (*Salmo trutta*). *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 17, 153–157.
- Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., Sedano, J., Martínez-Mazaneres, E., Vidaurreta, A., Borrego, J. J., ... & Toranzo, A. E. (1992). Isolation of *Pasteurella piscicida* from sea bass in southwestern Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 12.
- Bandyopadhyay, P., & Mohapatra, P. K. D. (2009). Effect of a probiotic bacterium *Bacillus circulans* PB7 in the formulated diets: on growth, nutritional quality and immunity of *Catla catla* (Ham.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35 (3), 467-478.
- Banerjee, S., Devaraja, T. N., Shariff, M., & Yusoff, F. M. (2007). Comparison of four antibiotics with indigenous marine *Bacillus* spp. in controlling pathogenic bacteria from shrimp and *Artemia*. *Journal of Fish Diseases*, 30 (7), 383-389.
- Bang, W., & Drake, M. A. (2005). Acid adaptation of *Vibrio vulnificus* and subsequent impact on stress tolerance. *Food Microbiology*, 22(4), 301-309.
- Barnes, A. C., Balebona, M. C., Horne, M. T., & Ellis, A. E. (1999). Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species. *Microbiology*, 145, 483-494.
- Barnes A. C., dos Santos, N. M. S., & Ellis, A. E. (2005). Update on bacterial vaccines: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Developments in Biologicals*, 121, 75–84.
- Bandyopadhyay, P., & Mohapatra, P. K. D. (2009). Effect of a probiotic bacterium *Bacillus circulans* PB7 in the formulated diets: on growth, nutritional quality and immunity of *Catla catla* (Ham.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35 (3), 467-478.
- Bates, J. M., Mittge, E., Kuhlman, J., Baden, K. N., Cheesman, S. E., & Guillemin, K. (2006). Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Developmental Biology*, 297(2), 374-386.
- Batista, S., Tapia-Paniagua, S. T., Morinigo, M. A., Nunez-Diaz, J. A., Goncalves, J. F. M., Barros, R., ... & Ozorio, R. O. A. (2013). Expression of immune response genes in sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) induced by dietary probiotic supplementation following exposure to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish and Shellfish Immunology*, 6 (34), 1638-1639.
- Batista, S., Medina, A., Pires, M. A., Moriñigo, M. A., Sansuwan, K., Fernandes, J. M. O., ... & Ozório, R. O. A. (2016). Innate immune response, intestinal morphology and microbiota changes in

- Senegalese sole fed plant protein diets with probiotics or autolysed yeast. *Applied microbiology and Biotechnology*, 100(16), 7223-7238.
- Batista, S., Ozório, R. O., Kollias, S., Dhanasiri, A. K., Lokesh, J., Kiron, V., ... & Fernandes, J. M. (2016). Changes in intestinal microbiota, immune-and stress-related transcript levels in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) fed plant ingredient diets intercropped with probiotics or immunostimulants. *Aquaculture*, 458, 149-157.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. T., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493.
- Becket, P., Gillan, D., Lanterbecq, D., Jangoux, M., Rasolofonirina, R., Rakotovao, J., ... & Eeckhaut, I. (2004). The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata). *Aquaculture*, 242, 13-30.
- Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87(1), 245-313.
- Begley, M., Gahan, C. G., & Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 625-651.
- Benítez-Dorta, V., Caballero, M. J., Izquierdo, M., Manchado, M., Infante, C., Zamorano, M. J., & Montero, D. (2013). Total substitution of fish oil by vegetable oils in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) diets: effects on fish performance, biochemical composition, and expression of some glucocorticoid receptor-related genes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39 (2), 335-349.
- Beranova-Giorgianni, S. (2003). Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *Trends in Analytical Chemistry*, 22(5), 273-281.
- Bernardeau, M., Vernoux, J. P., & Gueguen, M. (2001). Usefulness of epifluorescence for quantitative analysis of lactobacilli in probiotic feed. *Journal of Applied Microbiology*, 91 (6), 1103-1109.
- Bertone, S., Gili, C., Moizo, A. & Calegari, L. (1996). *Vibrio carchariae* associated with a chronic skin ulcer on a shark, *Carcharhinus plumbeus* (Nardo). *Journal of Fish Diseases* 19, 429-434.
- Bethke, J., Rojas, V., Berendsen, J., Cardenas, C., Guzman, F., Gallardo, J. A., ... & Mercado, L. (2012). Development of a new antibody for detecting natural killer enhancing factor (NKEF)-like protein in infected salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 35, 379-388.
- Beuchat, L. R. (1973). Interacting effects of pH, temperature, and salt concentration on growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied Microbiology*, 25 (5), 844-846.
- Bhugaloo-Vial, P., Dousset, X., Metivier, A., Sorokine, O., Anglade, P., Boyaval, P., ... & Marion, D. (1996). Purification and amino acid sequences of piscicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4410-4416.
- Biswas, J., & Paul, A. K. (2013). Production of extracellular enzymes by halophilic bacteria isolated from solar salterns. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 4(4), 30-36.
- Biswas, G., Korenaga, H., Nagamine, R., Kawahara, S., Takeda, S., Kikuchi, Y., ... & Sakai, M. (2013). Cytokine mediated immune responses in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) administered with heat-killed *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* (06TCa22) isolated from the Mongolian dairy product. *International Immunopharmacology*, 17(2), 358-365.
- Bjerrum, O. J. (1986). Buffer systems and transfer parameters for semi dry electroblotting with a horizontal apparatus. *Analytical electrophoresis*, 315-327.
- Boshra, H., Li, J., & Sunyer, J. O. (2006). Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 239-262.
- Bomba, A., Nemcová, R., Mudroňová, D., & Guba, P. (2002). The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 121-126.

- Boonthai, T., Vuthiphandchai, V., & Nimrat, S. (2011). Probiotic bacteria effects on growth and bacterial composition of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture Nutrition*, 17 (6), 634-644.
- Böttcher, T., & Sieber, S. A. (2008). β -lactones as specific inhibitors of ClpP attenuate the production of extracellular virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *Journal of the American Chemical Society*, 130, 14400-14401.
- Braber, L., & De Groot, S. J. (1973). The food of five flatfish species (Pleuronectiformes) in the southern North Sea. *Netherlands Journal of Sea Research*, 6 (1-2), 163-172.
- 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.
- Bricknell, I. R., King, J. A., Bowden, T. J., & Ellis, A. E. (1999). Duration of protective antibodies, and the correlation with protection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), following vaccination with an *Aeromonas salmonicida* vaccine containing iron-regulated outer membrane proteins and secretory polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, 9 (2), 139-151.
- Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830 (5), 3289-3303.
- Brock, J. A., & Bullis, R. (2001). Disease prevention and control for gametes and embryos of fish and marine shrimp. *Aquaculture*, 197, 137-159.
- Brötz-Oesterhelt, H., Beyer, D., Kroll, H. P., Endermann, R., Ladel, C., Schroeder, W., ... & Labischinski, H. (2005). Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. *Nature Medicine*, 11, 1082-1087.
- Brun, A., Bárcena, J., Blanco, E., Borrego, B., Dory, D., Escribano, J. M., ... & Dixon, L. K. (2011). Current strategies for subunit and genetic viral veterinary vaccine development. *Virus Research*, 157 (1), 1-12.
- Brudeseth, B. E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B. N., Lindmo, K., Løkling, K. E., Bordevik, M., ... & Gravningen, K. (2013). Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish & Shellfish Immunology*, 35 (6), 1759-1768.
- Brunt, J., & 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.
- Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., & Austin, B. (2007). The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 30, 573-579.
- Bucio Galindo A., Hartemink R., Schrama J.W., Verreth J., Bucio Galindo L., & Zwietering M.H. (2009). Kinetics of *Lactobacillus plantarum* 44a in the faeces of tilapia (*Oreochromis niloticus*) after its intake in feed. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1967-1975.
- Bunpa, S., Sermwittayawong, N., & Vuddhakul, V. (2016). Extracellular Enzymes Produced by *Vibrio alginolyticus* Isolated from Environments and Diseased Aquatic Animals. *Procedia Chemistry*, 18, 12-17.
- Busch, A., Herrmann, H.-H., Kühn, I., Simon, O., Struck, J., y Süphke, E. (2004). Probiotics in animal nutrition. Recuperado el 13 de junio de 2016 de <http://www.awt-feedadditives.org/ckfinder/userfiles/files/publication/NEU-Probiotika-EN.pdf>
- Bush, S. R., Belton, B., Hall, D., Vandergeest, P., Murray, F. J., Ponte, S., ... & Kusumawati, R. (2013). Certify sustainable aquaculture. *Science*, 341, 1067-1068.

C

- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8, 1137-1144.
- Cain, K. D., Jones, D. R., & Raison, R. L. (2000). Characterisation of mucosal and systemic immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using surface plasmon resonance. *Fish & Shellfish Immunology*, 10, 651-666.
- Candan, A., Kucker, M. A., & Karatas, S. (1996). Pasteurellosis in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 16, 150-153.
- Cañavate, J. P. (2011). Opciones del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 para diversificar la acuicultura marina. *Boletín. Instituto Español de Oceanografía*, 21(1-4), 147-154.
- Capkin, E., & Altinok, I. (2009). Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. *Journal of Applied Microbiology*, 106 (4), 1147-1153.
- Caroff, M., & Karibian, D. (2003). Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research*, 338 (23), 2431-2447.
- Carraturo, A., Raieta, K., Ottaviani, D., & Russo, G. L. (2006). Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* by a bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by *Vibrio mediterranei* 1. *Journal of Applied Microbiology*, 101(1), 234-241.
- Carson, J., Higgins, M. J., Wilson, T. K., Gudkovs, N., & Bryant, T. N. (2008). Identification of Vibrionaceae from Australian aquatic animals using phenotypic and PCR procedures. *Australian New Zealand Standard Diagnostic Procedures, Jan 2009*, 1-35.
- Castelo Branco, M. A. C., Arruda, M. A., & Gamito, S. (2010). Feeding habits of *Solea senegalensis* in earthen ponds in Sado estuary. *Journal of Sea Research*, 64, 446-450.
- Castro, N., Toranzo, A. E., Devesa, S., González, A., Nuñez, S., & Magariños, B. (2012). First description of *Edwardsiella tarda* in Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, 35, 79-82.
- Cebrián, R., Baños, A., Valdivia, E., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., & Maqueda, M. (2012). Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiology*, 30 (1), 59-67.
- Cecchini, F., Iacumin, L., Fontanot, M., Comi, G., & Manzano, M. (2012). Identification of the unculturable bacteria *Candidatus arthromitus* in the intestinal content of trouts using Dot blot and Southern blot techniques. *Veterinary Microbiology*, 156(3), 389-394.
- Cencič, A., & Langerholc, T. (2010). Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 4-14
- Cerdà-Cuellar, M., & Blanch, A. R. (2002). Detection and identification of *Vibrio scophthalmi* in the intestinal microbiota of fish and evaluation of host specificity. *Journal of Applied Microbiology*, 93 (2), 261-268.
- Cerezuela, R., Meseguer, J., & Esteban, M. A. (2012). Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture: a review. *Journal of Aquaculture & Research Development*, 3.
- Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S. T., Meseguer, J., Moriñigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2013a). Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. *Fish & Shellfish Immunology*, 34 (5), 1063-1070.
- Cerezuela, R., Meseguer, J., & Esteban, M. Á. (2013b). Effects of dietary inulin, *Bacillus subtilis* and microalgae on intestinal gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 34 (3), 843-848.

- Cha, J. H., Rahimnejad, S., Yang, S. Y., Kim, K. W., & Lee, K. J. (2013). Evaluations of *Bacillus* spp. as dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae* and as water additives. *Aquaculture*, 402, 50-57.
- Chabrillón, M., Rico, R. M., Arijo, S., Díaz-Rosales, P., Balebona, M. C., & Morínigo, M. A. (2005). Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, 28 (9), 531-537.
- Chakrabarti, S. R., Chaudhuri, K., Sen, K., & Das, J. (1996). Porins of *Vibrio cholerae*: purification and characterization of OmpU. *Journal of Bacteriology*, 178, 524-530.
- Chandra, R., & Rajan, M. R. (2009). Probiotic effect of intestinal bacteria of Koi carp *Cyprinus carpio* var. koi. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 3 (1), 363-366.
- Chen, Y., Zhang, Y. X., Fan, T. J., Meng, L., Ren, G. C., & Chen, S. L. (2006). Molecular identification and expression analysis of the natural killer cell enhancing factor (NKEF) gene from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 261(4), 1186-1193.
- Chen, Y., Li, J., Xiao, P., Li, G. Y., Yue, S., Huang, J., ... & Mo, Z. L. (2016). Isolation and characterization of *Bacillus* spp. M001 for potential application in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) against *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture Nutrition*, 22 (2), 374-381.
- Cheng, W., Liu, C. H., Kuo, C. M., & Chen, J. C. (2005). Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 18, 1-12.
- Cheng, S., Zhang, W. W., Zhang, M., & Sun, L. (2010). Evaluation of the vaccine potential of a cytotoxic protease and a protective immunogen from a pathogenic *Vibrio harveyi* strain. *Vaccine*, 28 (4), 1041-1047.
- Choi, S. H., Park, K. H., Yoon, T. J., Kim, J. B., Jang, Y. S., & Choe, C. H. (2008). Dietary Korean mistletoe enhances cellular non-specific immune responses and survival of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish & Shellfish Immunology*, 24, 67-73.
- Chiu, H. H., Chou, H. H., Jean, W. D., & Shieh, W. Y. (2007). Isolation and characterization of marine luminous bacteria from shallow coastal waters of Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection* 40 (1), 14.
- Chiu, K. H., & Liu, W. S. (2014). Dietary administration of the extract of *Rhodobacter sphaeroides* WL-APD911 enhances the growth performance and innate immune responses of seawater red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 418, 32-38.
- Cho, Y. A., Han, H. J., Mun, H. E., Jung, S. H., Park, M., & Kim, J. W. (2013). Characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from cultured starry flounder, *Platichthys stellatus* in Korea. *Journal of Fish Pathology*, 26 (2), 77-88.
- Chythanya, R., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2002). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture*, 208, 1-10.
- Chu, K. B., Abdulah, A., Abdullah, S. Z., & Bakar, R. A. (2013). A case study on the mortality of Cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in traditional cages. *Tropical Life Sciences Research*, 24, 77.
- Clark, T. G., & Cassidy-Hanley, D. (2005). Recombinant subunit vaccines: potentials and constraints. *Developments in Biologicals*, 121, 153-163.
- Clutterbuck, E. (2015). The biology of vaccine responses. *Nurse Prescribing*, 13(8).
- Collado, M. C., Grześkowiak, L., & Salminen, S. (2007). Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Current Microbiology*, 55, 260-265.
- Conejero, M. J. U., & Hedreyda, C. T. (2004). PCR detection of hemolysin (vhh) gene in *Vibrio harveyi*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 50, 137-142.

- Confer, A. W., & Ayalew, S. (2013). The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Veterinary Microbiology*, *163*, 207-222.
- Cordero, H., Guardiola, F. A., Meseguer, J., Cuesta, A., & Esteban, M. A. (2013). Effect of probiotic *Shewanella putrefaciens* on skin gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, *6* (34), 1701.
- Cordero, H., Morcillo, P., Cuesta, A., Brinchmann, M. F., & Esteban, M. A. (2016). Differential proteome profile of skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*) after probiotic intake and/or overcrowding stress. *Journal of Proteomics*, *132*, 41-50.
- Costas, B., Conceição, L. E., Aragão, C., Martos, J. A., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J. M., & Afonso, A. (2011). Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. *Aquaculture*, *316*(1), 68-76.
- Costas, B., Simões, I., Castro-Cunha, M., & Afonso, A. (2014). Non-specific immune responses of Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup), head-kidney leucocytes against *Tenacibaculum maritimum*. *Journal of Fish Diseases*, *37*, 765-769.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., & Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology*, *41* (1), 435-464.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, *284* (5418), 1318-1322.
- Courvalin, P. (2006). Antibiotic resistance: the pros and cons of probiotics. *Digestive and Liver Disease*, *38*, S261-S265.
- Cox, J. C., & Coulter, A. R. (1997). Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vaccine*, *15*, 248-256.
- Criado, M. T., Sánchez, S., y Ferreirós, C. M. (2008). Vacunología clásica y nuevas tecnologías en el diseño de vacunas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *26*, 564-572.
- Crosbie, P., & Nowak, B. (2004). Immune responses of barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), after administration of an experimental *Vibrio harveyi* bacterin by intraperitoneal injection, anal intubation and immersion. *Journal of Fish Diseases*, *27* (11), 623-632.
- Cross, R., Lloyd, D., Poole, R. K., & Moir, J. W. (2001). Enzymatic removal of nitric oxide catalyzed by cytochrome c' in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, *183*, 3050-3054.
- Cuesta, A., & Tafalla, C. (2009). Transcription of immune genes upon challenge with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in DNA vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine*, *27* (2), 280-289.

D

- D'Alvise, P. W., Lillebø, S., Wergeland, H. I., Gram, L., & Bergh, Ø. (2013). Protection of cod larvae from vibriosis by *Phaeobacter* spp.: a comparison of strains and introduction times. *Aquaculture*, *384*, 82-86.
- Daly, J. G., Griffiths, S. G., Kew, A. K., Moore, A. R., & Olivier, G. (2001). Characterization of attenuated *Renibacterium salmoninarum* strains and their use as live vaccines. *Diseases of Aquatic Organisms*, *44*, 121-126.

- Damodharan, K., Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., & Suh, J. W. (2015). In vitro probiotic characterization of *Lactobacillus* strains from fermented radish and their anti-adherence activity against enteric pathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, 61 (11), 837-850.
- Daniels, C. L., Merrifield, D. L., Boothroyd, D. P., Davies, S. J., Factor, J. R., & Arnold, K. E. (2010). Effect of dietary *Bacillus* spp. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. *Aquaculture*, 304(1), 49-57.
- Das, A., Nakhro, K., Chowdhury, S., & Kamilya, D. (2013). Effects of potential probiotic *Bacillus amyloliquifaciens* FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immune responses and disease resistance of catla (*Catla catla*). *Fish & Shellfish Immunology*, 35, 1547-1553.
- David, O. M., Olagunju, J. L., Adebayo, A. A., Oluwaniyi, T. T., & Olajide, M. O. (2016). Probiotic properties and antibiotic resistance pattern of *Bacillus* spp. isolated from two types of fermented locust bean (iru). *British Biotechnology Journal*, 10 (4), 1-12.
- Davidson, A. L., & Chen, J. (2004). ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 73 (1), 241-268.
- Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C., & Chen, J. (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2), 317-364.
- Davidson, L. E., Fiorino, A. M., Snyderman, D. R., & Hibberd, P. L. (2011). *Lactobacillus* GG as an immune adjuvant for live-attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 65 (4), 501-507.
- Dechamma, M. M., Rajeish, M., Maiti, B., Mani, M. K., & Karunasagar, I. (2015). Expression of Toll-like receptors (TLR), in lymphoid organ of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in response to *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture Reports*, 1, 1-4.
- De Azevedo, R. V., & Braga, L. G. T. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *Probiotic in Animals*, 6, 103-118.
- De Clerck, E., Vanhoutte, T., Hebb, T., Geerinck, J., Devos, J., & De Vos, P. (2004). Isolation, characterization, and identification of bacterial contaminants in semifinal gelatin extracts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3664-3672.
- De Jong, A., van Hijum, S.A., Bijlsma, J.J., Kok, J; Kuipers, O.P. (2006). BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Research*, 34, 273-279.
- De Schryver, P., Sinha, A. K., Kunwar, P. S., Baruah, K., Verstraete, W., Boon, N., ... & Bossier, P. (2010). Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1535-1541.
- Decho, A. W. (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research*, 20 (10), 1257-1273.
- Deep, S., & Kundu, S. (2015). Assessment of preliminary in vitro probiotic characteristics of the folate producing yogurt starter culture *Streptococcus* and *Lactobacillus* species. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 10 (3), 26-31.
- Del'Duca, A., Cesar, D. E., Diniz, C. G., & Abreu, P. C. (2013). Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescent in situ hybridization technique. *Aquaculture*, 388, 115-121.
- Defoirdt, T. (2014). Virulence mechanisms of bacterial aquaculture pathogens and antivirulence therapy for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 6 (2), 100-114.
- Deniz, G., Erten, G., Küçüksezer, U. C., Kocacik, D., Karagiannidis, C., Aktas, E., ... & Akdis, M. (2008). Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *The Journal of Immunology*, 180 (2), 850-857.

- Desoutter, M. (1990). Soleidae. In J.C. Quero, J.C. Hureau, C. Karrer, A. Post y L. Saldanha (eds.) *Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA)*. JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. Vol. 2. 1037 – 1049.
- Díaz-Rosales, P., Chabrilón, M., Moriñigo, M. A., & Balebona, M. C. (2003). Survival against exogenous hydrogen peroxide of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* under different culture conditions. *Journal of Fish Diseases*, 26 (5), 305-308.
- Díaz-Rosales, P., Chabrilón, M., Arijo, S., Martínez-Manzanares, E., Moriñigo, M. A., & Balebona, M. C. (2006). Superoxide dismutase and catalase activities in *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, 29, 355-364.
- Díaz-Rosales, P., Arijo, S., Chabrilón, M., Alarcon, F. J., Tapia-Paniagua, S. T., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C., ... & Moriñigo, M. A. (2009) Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*, 293, 16–21.
- Dinis, M. T., Ribeiro, L., Soares, F., & Sarasquete, C. (1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture*, 176 (1), 27-38.
- Directiva (CE) 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos Texto pertinente a efectos del Espacio Económico Europeo.
- Direkbusarakom, S., Yoshimizu, M., Ezura, Y., Ruangpan, L., & Danayadol, Y. (1998). *Vibrio spp.*, the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. *Journal of Marine Biotechnology*, 6, 266-267.
- do Vale, A., Magariños, B., Romalde, J. L., Lemos, M. L., Ellis, A. E., & Toranzo, A. E. (2002). Binding of haemin by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 48, 109-115.
- do Vale, A., Marques, F., & Silva, M. T. (2003). Apoptosis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 15 (2), 129-144.
- do Vale, A., Silva, M. T., dos Santos, N., Nascimento, D. S., Reis-Rodrigues, P., Costa-Ramos, C., ... & Azevedo, J. E. (2005). AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Molecular microbiology*, 58 (4), 1025-1038.
- Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1-6.
- Doron, S., & Snyderman, D. R. (2015). Risk and Safety of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60, S129-S134.
- Dos Santos, N., Do Vale, A., Da Silva, M., & Azevedo, J. (2013). *A derivative of a 55 kDa extracellular protein from Photobacterium damsela subsp. piscicida is the basis for a vaccine against Photobacterium infection, and thereby protects fish from pasteurellosis*. US Patent 8,343,507. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Duffes, F., Corre, C., Leroi, F., Dousset, X., & Boyaval, P. (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection*, 62 (12), 1394-1403.
- Dumetz, F., LaPatra, S. E., Duchaud, E., Claverol, S., & Le Henaff, M. (2007). The *Flavobacterium psychrophilum* OmpA, an outer membrane glycoprotein, induces a humoral response in rainbow trout. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1461-1470.
- Dunbar, B. S., Kimura, H., & Timmons, T. M. (1990). [34] Protein analysis using high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods in enzymology*, 182, 441-459.

Dyballa, N., & Metzger, S. (2009). Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (30).

E

Eddy, S. D., & Jones, S. H. (2002). Microbiology of summer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery. *Aquaculture*, 211 (1), 9-28.

El-Haroun, E. R., Goda, A. S., & Chowdhury, K. (2006). Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 37, 1473-1480.

El-Nobi, G. A., Reda, R. M., Hassanin, M. E., & Elmowalid, G. (2009). The impact of applications of probiotic “*Bacillus subtilis*” on health and growth of koi carp “*Cyprinus carpio*”. In *Proceeding of the 2nd Global Fisheries and Aquaculture Research Conference*.

Elkamel, A. A., Hawke, J. P., Henk, W. G., & Thune, R. L. (2003). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is capable of replicating in hybrid striped bass macrophages. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15, 175-183.

Elkamel, A. A., & Thune, R. L. (2003). Invasion and replication of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in fish cell lines. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15, 167-174.

Esselmann, M. T., & Liu, P. V. (1961). Lecithinase production by gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 81 (6), 939.

Esteban, M.A., (2012). An overview of the immunological defenses in fish skin. *ISRN Immunology*, 2012.

Esteban, M. A., Cordero, H., Martínez-Tomé, M., Jiménez-Monreal, A. M., Bakhrouf, A., & Mahdhi, A. (2014). Effect of dietary supplementation of probiotics and palm fruits extracts on the antioxidant enzyme gene expression in the mucosae of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 39 (2), 532-540.

Esteve-Gassent, M. D., Fouz, B., Barrera, R., & Amaro, C. (2004). Efficacy of oral reimmunisation after immersion vaccination against *Vibrio vulnificus* in farmed European eels. *Aquaculture*, 231 (1), 9-22.

Eubel, H., Braun, H. P., & Millar, A. (2005). Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions. *Plant Methods*, 1 (1), 11.

F

Farmer III, J. J., Janda, J. M., Brenner, F. W., Cameron, D. N., & Birkhead, K. M. (2005). Genus I. *Vibrio* Pacini 1854, 411AL. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2 (part B), 494-546.

Fast, M. D., Hosoya, S., Johnson, S. C., & Afonso, L. O. (2008). Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short-and long-term stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 24 (2), 194-204.

Ferguson, R. M. W., Merrifield, D. L., Harper, G. M., Rawling, M. D., Mustafa, S., Picchietti, S., ... & Davies, S. J. (2010). The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune

- status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology*, 109 (3), 851-862.
- Fernández, B., Le Lay, C., Jean, J., & Fliss, I. (2013). Growth, acid production and bacteriocin production by probiotic candidates under simulated colonic conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 114 (3), 877-885.
- Fernández-Trujillo, M. A., Porta, J., Manchado, M., Borrego, J. J., Alvarez, M. C., & Béjar, J. (2008). c-Lysozyme from Senegalese sole (*Solea senegalensis*): cDNA cloning and expression pattern. *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 697-700.
- Firdaus-Nawi, M., Yusoff, S. M., Yusof, H., Abdullah, S. Z., & Zamri-Saad, M. (2013). Efficacy of feed-based adjuvant vaccine against *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis* spp. in Malaysia. *Aquaculture Research*, 45 (1), 87-96.
- Fjellheim, A. J., Klinkenberg, G., Skjermo, J., Aasen, I. M., & Vadstein, O. (2010). Selection of candidate probiotics by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Veterinary Microbiology*, 144, 153-159.
- Fodey, T. L., Delahaut, P., Charlier, C., & Elliott, C. T. (2008). Comparison of three adjuvants used to produce polyclonal antibodies to veterinary drugs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 122, 25-34.
- Fondo Mundial de la Naturaleza. [Internet]. Sustainable seafood. Recuperado el 5 de noviembre de 2015 de <http://www.worldwildlife.org/industries/sustainable-seafood>
- Franke, A., Roth, O., & Clemmesen, C. (2013). Early stimulation of the immune system of an important aquaculture fish species: Probiotic application in European sea bass juveniles. *Fish & Shellfish Immunology*, 34 (6), 1707.
- Frans, I., Michiels, C. W., Bossier, P., Willems, K. A., Lievens, B., & Rediers, H. (2011). *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases*, 34 (9), 643-661.
- Frey, J. (2007). Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. *Vaccine*, 25, 5598-5605.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., ... & Rossi, P. (2002). Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, 4, 634-643.
- Fu, G. H., Bai, Z. Y., Xia, J. H., Liu, F., Liu, P., & Yue, G. H. (2013). Analysis of two lysozyme genes and antimicrobial functions of their recombinant proteins in Asian seabass. *PloS one*, 8(11), 1-12.
- Fukuda Y. & Kusuda R. (1981) Efficacy of vaccination for pseudotuberculosis in cultured yellowtail by various routes of administration. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 47, 147-150.
- Fukuda, Y., & Kusuda, R. (1985). Vaccination of yellowtail against pseudotuberculosis. *Fish Pathology*, 20(2/3), 421-425.
- Fukuda, Y., Matsuoka, S., Mizuno, Y., & Narita, K. (1996). *Pasteurella piscicida* infection in cultured juvenile Japanese flounder *Fish Pathology* 31, 33-38

G

- Gaden, E. L., Bokanga, M., Harlander, S., Hesseltine, C. W., & Steinkraus, K. H. (1992). Applications of Biotechnology in Traditional Fermented Food. *Report of an Ad Hoc Panel of the board on science and technology for international development*.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S15-S28.
- Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H., & Renault, T. (2006). Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish & Shellfish Immunology*, 20 (4), 536-547.
- Galach'yants, A. D., Bel'kova, N. L., Sukhanova, E. V., Romanovskaya, V. A., Gladka, G. V., Bedoshvili, E. D., & Parfenova, V. V. (2016). Diversity and physiological and biochemical properties of heterotrophic bacteria isolated from Lake Baikal neuston. *Microbiology*, 85(5), 604-613.
- Ganguly S. & Prasad A. (2012) Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 22, 11–16.
- Gao, X. Y., Xu, Y., Liu, Y., & Liu, Z. P. (2012). Bacterial diversity, community structure and function associated with biofilm development in a biological aerated filter in a recirculating marine aquaculture system. *Marine Biodiversity*, 42 (1), 1-11.
- García de la Banda, I., Lobo, C., León-Rubio, J. M., Tapia-Paniagua, S., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., ... & Arijó, S. (2010). Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*, 306 (1), 281-288.
- García-Rosado, E., Cano, I., Martín-Antonio, B., Labella, A., Manchado, M., Alonso, M. C., ... & Borrego, J. J. (2007). Co-occurrence of viral and bacterial pathogens in disease outbreaks affecting newly cultured sparid fish. *International Microbiology*, 10 (3), 193.
- Garmory, H. S., & Titball, R. W. (2004). ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. *Infection and Immunity*, 72, 6757-6763.
- Gatesoupe, F. (1990). The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers. *Aquaculture*, 89 (2), 139-148.
- Gatesoupe, F. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147-165.
- Gatesoupe, F. (2002). Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture*, 212, 347-360.
- Gatesoupe, F. (2005). Probiotics and prebiotics for fish culture, at the parting of the ways. *Aqua Feeds: Formulation & Beyond*, 2 (3), 3-5.
- Geng, X., Dong, X. H., Tan, B. P., Yang, Q. H., Chi, S. Y., Liu, H. Y., ... & Liu, X. Q. (2012). Effects of dietary probiotic on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture Nutrition*, 18, 46-55.
- Ghanbari, M., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2015). A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, 448, 464-475.
- Ghosh, S., Sinha, A., & Sahu, C. (2007). Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research*, 38 (5), 518-526.
- Giannenas, I., Karamaligas, I., Margaroni, M., Pappas, I., Mayer, E., Encarnação, P., & Karagouni, E. (2015). Effect of dietary incorporation of a multi-strain probiotic on growth performance and health status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 41 (1), 119-128.

- Gildberg, A., & Mikkelsen, H. (1998). Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture*, 167 (1), 103-113.
- Gillund, F., Dalmo, R., Tonheim, T. C., Seternes, T., & Myhr, A. I. (2008). DNA vaccination in aquaculture—expert judgments of impacts on environment and fish health. *Aquaculture*, 284, 25-34.
- Giono C.S. (1983). Prueba de Kirby-Bauer para sensibilidad a los antimicrobianos. *Infectología*, 3, 325.
- Giri, S. S., Sukumaran, V., & Oviya, M. (2013). Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34, 660-666.
- Giri, S. S., Sen, S. S., Jun, J. W., Park, S. C., & Sukumaran, V. (2016). Heat-killed whole-cell products of the probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG2 strain affect in vitro cytokine expression in head kidney macrophages of *Labeo rohita*. *Fish & Shellfish Immunology*, 50, 310-316.
- Gisbert, E., Castillo, M., Skalli, A., Andree, K. B., & Badiola, I. (2013). *Bacillus* var. *toyoi* promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. *Journal of Animal Science*, 91, 2766-2774.
- Givens, C. E., Bowers, J. C., DePaola, A., Hollibaugh, J. T., & Jones, J. L. (2014). Occurrence and distribution of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*—potential roles for fish, oyster, sediment and water. *Letters in Applied Microbiology*, 58 (6), 503-510.
- Gómez, G. D., & Balcázar, J. L. (2007). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52 (2), 145-154.
- Gómez-Gil, B., Herrera-Vega, M. A., Abreu-Grobois, F. A., & Roque, A. (1998). Bioencapsulation of two different vibrio species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2318-2322.
- Gómez-Gil, B., Roque, A., & Turnbull, J. F. (2000). The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191, 259-270.
- Gómez-Gil, B., Thompson, F. L., Thompson, C. C., & Swings, J. (2003). *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53 (1), 239-243.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., & 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.
- Gram, L., Løvold, T., Nielsen, J., Melchiorson, J., & Spanggaard, B. (2001). In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture*, 199, 1-11.
- Gravningen, K., Kestin, S., Thorarinnsson, R., & Syvertsen, C. (1998a). Oral vaccination against enteric red mouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). The effect of vaccine dose rate on protection against the disease. *Journal of Applied Ichthyology*, 14(3-4), 163-166
- Gravningen, K., Thorarinnsson, R., Johansen, L. H., Nissen, B., Rikardsen, K. S., Greger, E., & Vigneulle, M. (1998b). Bivalent vaccines for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis and pasteurellosis. *Journal of Applied Ichthyology*, 14(3-4), 159-162.
- Grimes, D. J., Gruber, S. H., & May, E. B. (1985). Experimental infection of lemon sharks, *Negaprion brevirostris* (Poey), with *Vibrio* species. *Journal of Fish Diseases*, 8, 173-180.
- Grisez, L., Reyniers, J., Verdonck, L., Swings, J., & Ollevier, F. (1997). Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. *Aquaculture*, 155(1-4), 387-399.

- Guardiola, F. A., Cuesta, A., Arizcun, M., Meseguer, J., & Esteban, M. A. (2014). Comparative skin mucus and serum humoral defence mechanisms in the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & Shellfish Immunology*, 36, 545-551
- Gullian, M., Thompson, F., & Rodriguez, J. (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233, 1-14.
- Guzmán-Villanueva, L. T., Tovar-Ramírez, D., Gisbert, E., Cordero, H., Guardiola, F. A., Cuesta, A., ... & Esteban, M. A. (2014). Dietary administration of β -1, 3/1, 6-glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression. *Fish & Shellfish Immunology*, 39 (1), 34-41.

H

- Haag, F., Adriouch, S., Braß, A., Jung, C., Möller, S., Scheuplein, F., ... & Koch-Nolte, F. (2007). Extracellular NAD and ATP: partners in immune cell modulation. *Purinergic Signalling*, 3, 71-81.
- Haldar, S., Maharajan, A., Chatterjee, S., Hunter, S. A., Chowdhury, N., Hinenoya, A., ... & Yamasaki, S. (2010). Identification of *Vibrio harveyi* as a causative bacterium for a tail rot disease of sea bream *Sparus aurata* from research hatchery in Malta. *Microbiological research*, 165, 639-648.
- Hamaguchi, M., & Kusuda, R. (1989). Field testing of *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterin against pseudotuberculosis in cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Bulletin of Marine Science and Fisheries Kochi University*, 11, 6-11.
- Hammami, R.; Zouhir, A; Ben Hamida, J.; & Fliss, I. (2007). BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology*, 7, 89.
- Han, Y., Chen, F., Li, N., Zhu, B., & Li, X. (2010). *Bacillus marcorestinum* sp. nov., a novel soil acylhomoserine lactone quorum-sensing signal quenching bacterium. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 507-520.
- Han, C., Ding, Z., Shi, H., Qian, W., Hou, X., & Lin, R. (2016). The role of probiotics in lipopolysaccharide-induced autophagy in intestinal epithelial cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38 (6), 2464-2478.
- Hanif, A., Bakopoulos, V., Leonardos, I., & Dimitriadis, G. J. (2005). The effect of sea bream (*Sparus aurata*) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and on the humoral immune parameters. *Fish & Shellfish Immunology*, 19 (4), 345-361.
- Hao, K., Liu, J. Y., Ling, F., Liu, X. L., Lu, L., Xia, L., & Wang, G. X. (2014). Effects of dietary administration of *Shewanella haliotis* D4, *Bacillus cereus* D7 and *Aeromonas bivalvium* D15, single or combined, on the growth, innate immunity and disease resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 428, 141-149.
- Harikrishnan, R., Kim, M. C., Kim, J. S., Balasundaram, C., & Heo, M. S. (2011). Immunomodulatory effect of probiotics enriched diets on *Uronema marinum* infected olive flounder. *Fish & Shellfish Immunology*, 30 (3), 964-971
- Harikrishnan, R., Kim, J. S., Balasundaram, C., & Heo, M. S. (2012). Vaccination effect of liposomes entrapped whole cell bacterial vaccine on immune response and disease protection in *Epinephelus bruneus* against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 342, 69-74.
- Hatten, F., Fredriksen, Å., Hordvik, I., & Endresen, C. (2001). Presence of IgM in cutaneous mucus, but not in gut mucus of Atlantic salmon, *Salmo salar*. Serum IgM is rapidly degraded when added to gut mucus. *Fish & Shellfish Immunology*, 11, 257-268.

- Hawke, J. P., Plakas, S. M., Minton, R. V., McPhearson, R. M., Snider, T. G., & Guarino, A. M. (1987). Fish pasteurellosis of cultured striped bass (*Morone saxatilis*) in coastal Alabama. *Aquaculture*, 65, 193-204
- He, S., Zhou, Z., Liu, Y., Shi, P., Yao, B., Ringø, E., & Yoon, I. (2009). Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on growth performance, intestinal autochthonous bacterial community and non-specific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀ × *O. aureus*♂) cultured in cages. *Aquaculture*, 294 (1), 99-107.
- He, S., Liu, W., Zhou, Z., Mao, W., Ren, P., Marubashi, T., & Ringø, E. (2011). Evaluation of probiotic strain *Bacillus subtilis* C-3102 as a feed supplement for koi carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Aquaculture & Research Development*, 3.
- He, S., Zhang, Y., Xu, L., Yang, Y., Marubashi, T., Zhou, Z., ... & Yao, B. (2013). Effects of dietary *Bacillus subtilis* C-3102 on the production, intestinal cytokine expression and autochthonous bacteria of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus*♀ × *Oreochromis aureus*♂. *Aquaculture*, 412, 125-130.
- Helmerhorst, E. J., Maaskant, J. J., & Appelmelk, B. J. (1998). Anti-lipid A monoclonal antibody centoxin (HA-1A) binds to a wide variety of hydrophobic ligands. *Infection and Immunity*, 66(2), 870-873.
- Heng, N. C., & Tagg, J. R. (2006). What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, 4.
- Henke, J. M., & Bassler, B. L. (2004). Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 186 (12), 3794-3805.
- Heo, W. S., Kim, Y. R., Kim, E. Y., Bai, S. C., & Kong, I. S. (2013). Effects of dietary probiotic, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I2, supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 376, 20-24.
- Hernandez, G., & Olmos, J. (2004). Molecular identification of pathogenic and nonpathogenic strains of *Vibrio harveyi* using PCR and RAPD. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 722-727.
- Hicks, R. E., Amann, R. I., & Stahl, D. A. (1992). Dual staining of natural bacterioplankton with 4', 6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2158-2163.
- Hidalgo, M. C., Urea, E., & Sanz, A. (1999). Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170 (3), 267-283.
- Hindler J. (1992). Antimicrobial susceptibility testing. In: Isenberg H.D. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: American Society of Microbiology.
- Hjelm, M., Bergh, Ø., Riaza, A., Nielsen, J., Melchiorson, J., Jensen, S., & Gram, L. (2004). Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 360-371.
- Ho, L. P., Lin, J. H. Y., Liu, H. C., Chen, H. E., Chen, T. Y., & Yang, H. L. (2011). Identification of antigens for the development of a subunit vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30 (1), 412-419.
- Ho, L. P., Chang, C. J., Liu, H. C., Yang, H. L., & Lin, J. Y. (2014). Evaluating the protective efficacy of antigen combinations against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* infections in cobia, *Rachycentron canadum* L. *Journal of Fish Diseases*, 37 (1), 51-62.
- Hovda, M. B., Fontanillas, R., McGurk, C., Obach, A., & Rosnes, J. T. (2012). Seasonal variations in the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*, 43 (1), 154-159.
- Hoyt, P. R., & Sizemore, R. K. (1982). Competitive dominance by a bacteriocin-producing *Vibrio harveyi* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 653-658.

- Hu, Y. H., & Sun, L. (2011). A bivalent *Vibrio harveyi* DNA vaccine induces strong protection in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Vaccine*, 29, 4328-4333.
- Huang, R., Gao, L. Y., Wang, Y. P., Hu, W., & Guo, Q. L. (2009). Structure, organization and expression of common carp (*Cyprinus carpio* L.) NKEF-B gene. *Fish & Shellfish Immunology*, 26 (2), 220-229.
- Huang, J. B., Wu, Y. C., & Chi, S. C. (2014). Dietary supplementation of *Pediococcus pentosaceus* enhances innate immunity, physiological health and resistance to *Vibrio anguillarum* in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & Shellfish Immunology*, 39, 196-205.
- Huber, I., Spanggaard, B., Appel, K. F., Rossen, L., Nielsen, T., & Gram, L. (2004). Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 96 (1), 117-132.
- Huchette, S. M. H., & Clavier, J. (2004). Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.) industry in Europe. *Journal of Shellfish Research*, 23 (4), 951-956.
- Huys, G., Vancanneyt, M., D'Haene, K., Vankerckhoven, V., Goossens, H., & Swings, J. (2006). Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Research in Microbiology*, 157 (9), 803-810.

I

- Ibrahim, F., & Vesterlund, S. (2014). Lactococcus lactis ssp. lactis as Protective Culture in Vacuum-Packed Raw Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 23 (6), 601-607.
- Ige, B. A. (2013). Probiotics use in intensive fish farming. *African Journal of Microbiology Research*, 7, 2701-2711.
- Imamura, S., da Silva Vaz Jr, I., Konnai, S., Yamada, S., Nakajima, C., Onuma, M., ... & Ohashi, K. (2009). Effect of vaccination with a recombinant metalloprotease from *Haemaphysalis longicornis*. *Experimental and Applied Acarology*, 48, 345-358.
- Ingmer, H., & Brøndsted, L. (2009). Proteases in bacterial pathogenesis. *Research in Microbiology*, 160, 704-710. *Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas*
- Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio [Internet]. Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters for Veterinary Antimicrobial Agents 2002. Recuperado el 1 de enero de 2018 de <https://goo.gl/BafFKM>
- Irianto, A., & Austin, B. (2002a). Probiotics in aquaculture. *Journal of fish diseases*, 25, 633-642.
- Irianto, A., & Austin, B. (2002b). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 25, 333-342.
- Irianto, A., & Austin, B., (2003). Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 26, 59-62.
- Irie, T., Watarai, S., Iwasaki, T., & Kodama, H. (2005). Protection against experimental *Aeromonas salmonicida* infection in carp by oral immunisation with bacterial antigen entrapped liposomes. *Fish & Shellfish Immunology*, 18(3), 235-242.
- Ishimaru, K. and Muroga, K. (1997) Taxonomical re-evaluation of two pathogenic *Vibrio* species isolated from milkfish and swimming crab. *Fish Pathology*, 32, 59-64.
- Itano, T., Kawakami, H., Kono, T., & Sakai, M. (2006). Live vaccine trials against nocardiosis in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture*, 261, 1175-1180.

- Iturria, I., Nacher-Vazquez, M., David, G., Valcarce, V. R., y Rainieri, S. (2015). El modelo *in vivo* pez cebra para evaluar las propiedades probióticas de bacterias en acuicultura. Recuperado el 13 de junio de 2016 de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=ES2015B02422>
- Iwashita, M. K. P., Nakandakare, I. B., Terhune, J. S., Wood, T., & Ranzani-Paiva, M. J. T. (2015). Dietary supplementation with *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 43(1), 60-66.
- ## J
- Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 44, 223-270.
- Janning, B., & In't Veld, P. H. (1994). Susceptibility of bacterial strains to desiccation: a simple method to test their stability in microbiological reference materials. *Analytica Chimica Acta*, 286 (3), 469-476.
- Janssen, W. A., & Surgalla, M. J. (1968). Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). *Journal of Bacteriology*, 96 (5), 1606-1610.
- Jayasree, L., Janakiram, P., & Madhavi, R. (2006). Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). *Journal of the World Aquaculture Society*, 37, 523-532.
- Jenkins, G. A., Figueira, M., Kumar, G. A., Sweetman, W. A., Makepeace, K., Pelton, S. I., ... & Hood, D. W. (2010). Sialic acid mediated transcriptional modulation of a highly conserved sialometabolism gene cluster in *Haemophilus influenzae* and its effect on virulence. *BMC Microbiology*, 10 (1), 48.
- Jin, Y., Liu, Z., Peng, T., & Fu, Z. (2015). The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: a survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. *Fish & Shellfish Immunology*, 43(2), 405-414.
- Juiz-Río, S. J., Osorio, C. R., & Lemos, M. L. (2005). Heme uptake genes in human and fish isolates of *Photobacterium damsela*: existence of hutA pseudogenes. *Archives of Microbiology*, 183, 347-358.
- Jung, T. S., Del Castillo, C. S., Javaregowda, P. K., Dalvi, R. S., Nho, S. W., Park, S. B., ... & Aoki, T. (2012). Seasonal variation and comparative analysis of non-specific humoral immune substances in the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Developmental & Comparative Immunology*, 38 (2), 295-301.
- Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos [Internet]. Acuicultura marina Año 2015. Recuperado el 13 de junio de 2016 de http://www.mapama.gob.es/es/pesca/temas/acuicultura/produccion_engorde_2015_tcm7-429082.pdf

K

- Kaihami, G. H., de Almeida, J. R. F., dos Santos, S. S., Netto, L. E. S., de Almeida, S. R., & Baldini, R. L. (2014). Involvement of a 1-Cys peroxiredoxin in bacterial virulence. *PLoS pathogens*, *10* (10), 1-10.
- Kaila M., Isolauri E., & Soppi E. (1992). Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhoea by a human Lactobacillus strain. *Pediatric Research*, *32*, 141-144.
- Kaito, C., Kurokawa, K., Matsumoto, Y., Terao, Y., Kawabata, S., Hamada, S., ... & Sekimizu, K. (2005). Silkworm pathogenic bacteria infection model for identification of novel virulence genes. *Molecular Microbiology*, *56*, 934-944.
- Kamilya, D., Maiti, T. K., Joardar, S. N., & Mal, B. C. (2006). Adjuvant effect of mushroom glucan and bovine lactoferrin upon *Aeromonas hydrophila* vaccination in catla, *Catla catla* (Hamilton). *Journal of Fish Diseases*, *29*, 331-337.
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G. R., & Karunasagar, I. (1994). Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, *128*, 203-209.
- Kato, G., Yamashita, K., Kondo, H., & Hirono, I. (2015). Protective efficacy and immune responses induced by a DNA vaccine encoding codon-optimized PPA1 against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in Japanese flounder. *Vaccine*, *33*, 1040-1045.
- Kawahara, E., & Kusuda, R. (1987). Location of *Pasteurella piscicida* antigens in tissues of yellowtail *Seriola quinqueradiata* vaccinated by immersion. *Nippon Suisan Gakkaishi*. *54*, 1101-1105.
- Kawai, K., Liu, Y., Ohnishi, K., & Oshima, S. I. (2004). A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate. *Vaccine*, *22* (25), 3411-3418.
- Kawakami, H., Shinohara, N., Fukuda, Y., Yamashita, H., Kihara, H., & Sakai, M. (1997). The efficacy of lipopolysaccharide mixed chloroform-killed cell (LPS-CKC) bacterin of *Pasteurella piscicida* on Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture*, *154* (2), 95-105.
- Keyser, P., Elofsson, M., Rosell, S., & Wolf-Watz, H. (2008). Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria. *Journal of Internal Medicine*, *264* (1), 17-29.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, *274*, 1-14.
- Khouadja, S., Haddaji, N., Hanchi, M., & Bakhrouf, A. (2017). Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics for *Vibrio parahaemolyticus* depuration in pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture Research*, *48* (4), 1885-1894.
- Khushiramani, R. M., Maiti, B., Shekar, M., Girisha, S. K., Akash, N., Deepanjali, A., ... & Karunasagar, I. (2012). Recombinant *Aeromonas hydrophila* outer membrane protein 48 (Omp48) induces a protective immune response against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda*. *Research in Microbiology*, *163*, 286-291.
- Kim, S. R., Nonaka, L., & Suzuki, S. (2004). Occurrence of tetracycline resistance genes tet (M) and tet (S) in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiology Letters*, *237*, 147-156.
- Kim, D. H., & Austin, B. (2006). Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish & Shellfish Immunology*, *21*, 513-524.
- Kim, J. S.; Hari Krishnan, R.; Kim, M. C.; Balasundaram, C.; Heo, M. S., (2010). Dietary administration of *Zooshikella* sp. to enhance the innate immune response and disease resistance of *Paralichthys olivaceus* against *Streptococcus iniae*. *Fish and Shellfish Immunology*, *29*, 104-110.
- Kim, J. W., Choi, H. S., Kwon, M. G., Park, M. A., Hwang, J. Y., Kim, D. H., & Park, C. I. (2011). Molecular identification and expression analysis of a natural killer cell enhancing factor

- (NKEF) from rock bream *Oplegnathus fasciatus* and the biological activity of its recombinant protein. *Results in Immunology*, 1(1), 45-52.
- Kim, D. H., & Kim, D. Y. (2013). Microbial diversity in the intestine of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 414, 103-108.
- Kimura T, & Kitao T (1971). On the causative agent of tuberculoidosis of yellowtail. *Fish Pathology*, 6, 8-14.
- Kiran, T., Asad, W., Siddiqui, S., Ajaz, M., & Rasool, S. A. (2015). Industrially important hydrolytic enzyme diversity explored in stove ash bacterial isolates. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(6), 2035-40.
- Kirsop, B. E., & Doyle, A. (1991). *Maintenance of microorganisms and cultured cells* (pp. 17-18). London: Academic Press.
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12, 39-85.
- Klose, V., Bayer, K., Bruckbeck, R., Schatzmayr, G., & Loibner, A. P. (2010). In vitro antagonistic activities of animal intestinal strains against swine-associated pathogens. *Veterinary microbiology*, 144(3-4), 515-521.
- Korkea-aho, T. L., Heikkinen, J., Thompson, K. D., Von Wright, A., & Austin, B. (2011). *Pseudomonas* sp. M174 inhibits the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 266-277.
- Korkea-aho, T. L., Papadopoulou, A., Heikkinen, J., Von Wright, A., Adams, A., Austin, B., & Thompson, K. D. (2012). *Pseudomonas* M162 confers protection against rainbow trout fry syndrome by stimulating immunity. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 24-35.
- Korotaevskiy, A. A., Hanin, L. G., & Khanin, M. A. (2009). Non-linear dynamics of the complement system activation. *Mathematical Biosciences*, 222(2), 127-143.
- Kraxberger-Beatty, T., McGarey, D.J., Grier, H.J. & Lim, D.V. (1990). *Vibrio harveyi*, an opportunistic pathogen of common snook, *Centropomus undecimalis* (Block), held in captivity. *Journal of Fish Diseases*, 13, 557-560.
- Kumar, S. R., Parameswaran, V., Ahmed, V. I., Musthaq, S. S., & Hameed, A. S. (2007). Protective efficiency of DNA vaccination in Asian seabass (*Lates calcarifer*) against *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23, 316-326.
- Kurath, G., Garver, K. A., Corbeil, S., Elliott, D. G., Anderson, E. D., & LaPatra, S. E. (2006). Protective immunity and lack of histopathological damage two years after DNA vaccination against infectious hematopoietic necrosis virus in trout. *Vaccine*, 24, 345-354.
- Kusuda, R., & Hamaguchi, M. (1988). The efficacy of attenuated live bacterine of *Pasteurella piscicida* against pseudotuberculosis in yellowtail *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 8, 50.
- Kusuda, R., Ninomiya, M., Hamaguchi, M., & Muraoka, A. (1988). The efficacy of ribosomal vaccine prepared from *Pasteurella piscicida* against pseudotuberculosis in cultured yellowtail. *Fish Pathology*, 23(3), 191-196.
- Kusuda, R., & Salati, F. (1993). Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 69-85.

L

- Labas, V., Krin, E., Tendeng, C., Soutourina, O., Danchin, A., & Bertin, P. (2002). Effect of mild acid pH on the functioning of bacterial membranes in *Vibrio cholerae*. *Proteomics*, 2, 571-579.
- Labella, A., Vida, M., Alonso, M. C., Infante, C., Cardenas, S., Lopez-Romalde, S., ... & Borrego, J. J. (2006). First isolation of *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* from cultured redbanded seabream, *Pagrus auriga Valenciennes*, in Spain. *Journal of Fish Diseases*, 29 (3), 175-179.
- Lamari, F., Castex, M., Larcher, T., Ledevin, M., Mazurais, D., Bakhrouf, A., & Gatesoupe, F. J. (2013). Comparison of the effects of the dietary addition of two lactic acid bacteria on the development and conformation of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax*, and the influence on associated microbiota. *Aquaculture*, 376, 137-145.
- Lambert, P. A. (1988). Enterobacteriaceae: composition, structure and function of the cell envelope. *Journal of Applied Bacteriology*, 65 (s17).
- Lång, H., Mäki, M., Rantakari, A., & Korhonen, T. K. (2000). Characterization of adhesive epitopes with the OmpS display system. *European Journal of Biochemistry*, 267, 163-170.
- Langer T (2000). AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 247-251.
- Langklotz, S., Schäkermann, M., & Narberhaus, F. (2011). Control of lipopolysaccharide biosynthesis by FtsH-mediated proteolysis of LpxC is conserved in enterobacteria but not in all gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 193, 1090-1097.
- Langklotz, S., Baumann, U., & Narberhaus, F. (2012). Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823, 40-48.
- LaPatra, S. E., Fehring, T. R., & Cain, K. D. (2014). A probiotic *Enterobacter* sp. provides significant protection against *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after injection by two different routes. *Aquaculture*, 433, 361-366.
- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M. A., Guzmán-Méndez, B. E., & López-Madrid, W. (2003). Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216, 193-201.
- Lara-Flores, M., & Aguirre-Guzmán, G. (2009). The use of probiotic in fish and shrimp aquaculture. A review. Probiotics: production, evaluation and uses in animal feed. *Research Signpost*, 75-89.
- Lara-Flores, M. (2011). The use of probiotic in aquaculture: an overview. *International Research Journal of Microbiology*, 2, 471-478.
- Larsen, A. M., Mohammed, H. H., & Arias, C. R. (2014). Comparison of DNA extraction protocols for the analysis of gut microbiota in fishes. *FEMS microbiology letters*, 362(5), fnu031.
- Lategan, M. J., & 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.
- Lauková, A., Guba, P., Nemcová, R., & Vasilková, Z. (2003). Reduction of *Salmonella* in gnotobiotic Japanese quails caused by the enterocin A-producing EK13 strain of *Enterococcus faecium*. *Veterinary Research Communications*, 27, 275-280.
- Lauzon, H. L., Magnússon, H., Sveinsdóttir, K., Gudjónsdóttir, M., & Martinsdóttir, E. (2009). Effect of brining, modified atmosphere packaging, and superchilling on the shelf life of cod (*Gadus morhua*) loins. *Journal of Food Science*, 74(6), M258-M267.
- Lauzon, H. L., Gudmundsdóttir, S., Steinarsson, A., Oddgeirsson, M., Pétursdóttir, S. K., Reynisson, E., ... & Gudmundsdóttir, B. K. (2010). Effects of bacterial treatment at early stages of Atlantic cod

- (*Gadus morhua* L.) on larval survival and development. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 624-632.
- Lavilla-Pitogo, C. R., Leano, E. M., & Paner, M. G. (1998). Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture*, 164, 337-349.
- Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., Gallage, S., Brinchmann, M. F., & Kiron, V. (2010). Expression profiles of genes associated with immune response and oxidative stress in Atlantic cod, *Gadus morhua* head kidney leukocytes modulated by live and heat-inactivated intestinal bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 155(3), 249-255.
- Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., Brinchmann, M. F., & Kiron, V. (2011). In vitro adherence of two candidate probiotics from Atlantic cod and their interference with the adhesion of two pathogenic bacteria. *Veterinary Microbiology*, 148, 252-259.
- Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., & Kiron, V. (2012). Enzymes from the gut bacteria of Atlantic cod, *Gadus morhua* and their influence on intestinal enzyme activity. *Aquaculture Nutrition*, 18(4), 423-431.
- Lazado, C. C., & Caipang, C. M. A. (2014). Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 39, 78-89.
- Le Breton, A. D. (1999). Mediterranean finfish pathologies: present status and new developments in prophylactic methods. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 19, 250-253.
- Le Breton, A. D. (2009). Vaccines in Mediterranean aquaculture: practice and needs. *Options Méditerranéennes*, 86, 147-154.
- Le Loir, Y., Azevedo, V., Oliveira, S. C., Freitas, D. A., Miyoshi, A., Bermúdez-Humarán, L. G., ... & Langella, P. (2005). Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microbial Cell Factories*, 4, 2.
- Lee, K. K., Yu, S. R., Chen, F. R., Yang, T. I., & Liu, P. C. (1996). News & notes: virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Current Microbiology*, 32, 229-231.
- Lee, K.K., Liu, P.C., & Chuang, W.H. (2002) Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Marine Biotechnology*, 4, 267-277.
- Lee, J. S., Cheng, H., Damte, D., Lee, S. J., Kim, J. C., Rhee, M. H., ... & Park, S. C. (2013). Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus pentosus* PL11 on the growth performance, immune and antioxidant systems of Japanese eel *Anguilla japonica* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(3), 756-761.
- Lee, J. S., Damte, D., Lee, S. J., Hossain, M. A., Belew, S., Kim, J. Y., ... & Park, S. C. (2015). Evaluation and characterization of a novel probiotic *Lactobacillus pentosus* PL11 isolated from Japanese eel (*Anguilla japonica*) for its use in aquaculture. *Aquaculture Nutrition*, 21(4), 444-456.
- Lei, K., Li, Y. L., Wang, Y., Wen, J., Wu, H. Z., Yu, D. Y., ... & Li, W. F. (2015). Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* B10 on biochemical and molecular parameters in the serum and liver of high-fat diet-induced obese mice. *Journal of Zhejiang University Science B*, 16, 487-495.
- Lenski R.E., & Riley M.A. (2002) Chemical warfare from an ecological perspective. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99,556-558
- Li, R. W., & Waldbieser, G. C. (2006). Genomic organisation and expression of the natural killer cell enhancing factor (NKEF) gene in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Fish & Shellfish Immunology*, 20 (1), 72-82.
- Li, M. F., Sui, Z. H., & Sun, L. (2017). A teleost CD46 is involved in the regulation of complement activation and pathogen infection. *Scientific Reports*, 7(1), 15028.

- Lillehaug, A. (1989). A cost-effectiveness study of three different methods of vaccination against vibriosis in salmonids. *Aquaculture*, 83, 227-236.
- Lin J.H.Y., Chen T.Y., Chen M.S., Chen H.E., Chou R.L., Chen T.I., Su M.S., ... & Yang H.L. (2006) Vaccination with three inactivated pathogens of cobia (*Rachycentron canadum*) stimulates protective immunity. *Aquaculture* 255, 125–132.
- Liu, P. V. (1957). Survey of hemolysin production among species of pseudomonads. *Journal of Bacteriology*, 74, 718.
- Liu, P. C., Lee, K. K., & Chen, S. N. (1996). Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, 22, 413-416.
- Liu, P. C., Lee, K. K., Tu, C. C., & Chen, S. N. (1997). Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. *Current Microbiology*, 35, 32-39.
- Liu, P. C., Lin, J.Y., & Lee, K.K., (2003). Virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in culture cobia *Rachycentron canadum*. *Journal of Basic Microbiology*, 43, 499–507.
- Liu, Y., Zhou, Z., Yao, B., He, S., Hølvold, L. B., & Ringø, E. (2008). Effect of intraperitoneal injection of immunostimulatory substances on allochthonous gut microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) determined using denaturing gradient gel electrophoresis. *Aquaculture Research*, 39 (6), 635-646
- Liu, H., Li, Z., Tan, B., Lao, Y., Duan, Z., Sun, W., & Dong, X. (2014). Isolation of a putative probiotic strain S12 and its effect on growth performance, non-specific immunity and disease-resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 300-307.
- Liu, L., Gong, Y. X., Zhu, B., Liu, G. L., Wang, G. X., & Ling, F. (2015). Effect of a new recombinant *Aeromonas hydrophila* vaccine on the grass carp intestinal microbiota and correlations with immunological responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 45 (1), 175-183.
- Llewellyn, M. S., Boutin, S., Hoseinifar, S. H., & Derome, N. (2014). Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Lobo, C., García de la Banda, I., León-Rubio, J. M., Moriñigo, M. A., Arijo, S., Moreno-Ventas, X., & Canteras, J. C. (2010). Pdp11 *Shewanella* probiotic addition on larval senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup) culture. In *European Aquaculture Society Meeting* (pp. 5-9).
- Lobo, C., Moreno-Ventas, X., Tapia-Paniagua, S., Rodríguez, C., Morinigo, M. A., & de La Banda, I. G. (2014). Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in Senegalese sole larviculture. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40 (1), 295-309.
- Longeon, A., Peduzzi, J., Barthelemy, M., Corre, S., Nicolas, J. L., & Guyot, M. (2004). Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. *Marine Biotechnology*, 6 (6), 633-641.
- Longyant, S., Rukpratanporn, S., Chaivisuthangkura, P., Suksawad, P., Srisuk, C., Sithigorngul, W., ... & Sithigorngul, P. (2008). Identification of *Vibrio* spp. in vibriosis *Penaeus vannamei* using developed monoclonal antibodies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98, 63-68.
- Lopez, C., Rajan, P. R., Lin, J. H. Y., Kuo, T., & Yang, H. (2002). Disease outbreak in seafarmed cobia. *Rachycentron canadum* associated with *Vibrio* Spp., *Photobacterium damsela* ssp *piscicida*, monogenean and myxosporean parasites. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 22(3), 206-211.
- Lopez Cazorla, A., Sica, M. G., Brugnioni, L. I., Marucci, P. L., & Cubitto, M. A. (2015). Evaluation of *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isolated from Jenyn's sprat (*Ramnogaster arcuata*) as probiotic for juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of Applied Ichthyology*, 31(1), 88-94.

- López-Dóriga, M. V., Barnes, A. C., dos Santos, N. M., & Ellis, A. E. (2000). Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum. *Microbiology*, *146*, 21-30.
- Lorenzen, N., & LaPatra, S. E. (2005). DNA vaccines for aquacultured fish. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, *24*.
- Lun, J., Xia, C., Yuan, C., Zhang, Y., Zhong, M., Huang, T., & Hu, Z. (2014). The outer membrane protein, LamB (maltoporin), is a versatile vaccine candidate among the *Vibrio* species. *Vaccine*, *32*, 809-815.

M

- Maassen, C. B., Boersma, W. J., van Holten-Neelen, C., Claassen, E., & Laman, J. D. (2003). Growth phase of orally administered *Lactobacillus* strains differentially affects IgG1/IgG2a ratio for soluble antigens: implications for vaccine development. *Vaccine*, *21*, 2751-2757.
- Magariños, B., Noya, M., Romalde, J. L., Perez, G., & Toranzo, A. E. (1994a). Influence of fish size and vaccine formulation on the protection of gilthead seabream against *Pasteurella piscicida*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, *14* (4), 121-124.
- Magariños, B., Romalde, J. L., Lemos, M. L., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1994b). Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*, 2990-2998.
- Magariños B., Romalde J.L., Santos Y., Casal J.F., Barja J.L. & Toranzo A.E. (1994c) Vaccination trials on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*. *Aquaculture*, *120*,201–208
- Magariños, B., Bonet, R., Romalde, J. L., Martí, M. J., Congregado, F., & Toranzo, A. E. (1996a). Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microbial Pathogenesis*, *21*, 289-297.
- Magariños, B., Toranzo, A. E., & Romalde, J. L. (1996b). Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annual Review of Fish Diseases*, *6*, 41-64.
- Magariños, B., Romalde, J. L., López-Romalde, S., Moriñigo, M. A., & Toranzo, A. E. (2003). Pathobiological characterisation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, *23*, 183-190.
- Magariños, B., Devesa, S., González, A., Castro, N., & Toranzo, A. E. (2011). Furunculosis in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) cultured in a recirculation system. *Veterinary Record-English Edition*, *168* (16), 431.
- Magnadottir, B. (2010). Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology*, *12*, 361-379.
- Mahdhi, A., Hmila, Z., Behi, A., & Bakhrouf, A. (2011). Preliminary characterization of the probiotic properties of *Candida famata* and *Geobacillus thermoleovorans*. *Iranian Journal of Microbiology*, *3*(3), 129-134.
- Mahdhi, A., Slama, R. B., Leban, N., & Bakhrouf, A. (2012). Change in physiological cellular state of halophilic *Bacillus* sp. under long marine stress starvation conditions. *African Journal of Microbiology Research*, *6*(31), 6099-6105.
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, *4* (9), 429.

- Maidens, C., Childs, C., Przemska, A., Dayel, I. B., & Yaqoob, P. (2013). Modulation of vaccine response by concomitant probiotic administration. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 663-670.
- Maiti, B., Shetty, M., Shekar, M., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2011). Recombinant outer membrane protein A (OmpA) of *Edwardsiella tarda*, a potential vaccine candidate for fish, common carp. *Microbiological research*, 167(1), 1-7.
- Makeesh, M., Sudheesh, P. S., & Cain, K. D. (2015). Systemic and mucosal immune response of rainbow trout to immunization with an attenuated *Flavobacterium psychrophilum* vaccine strain by different routes. *Fish & Shellfish Immunology*, 44 (1), 156-163
- Makinen, K., Berger, B., Bel-Rholid, R., & Ananta, E. (2012). Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *Journal of Biotechnology*, 162 (4), 356-365.
- Makridis, P., Fjellheim, A. J., Skjermo, J., & Vadstein, O. (2000). Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or bioencapsulated in rotifers. *Aquaculture International*, 8, 367-380.
- Manchado, M., Infante, C., Asensio, E., & Cañavate, J. P. (2007). Differential gene expression and dependence on thyroid hormones of two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Gene*, 400(1), 1-8.
- Manchado, M., Salas-Leiton, E., Infante, C., Ponce, M., Asensio, E., Crespo, A., ... & Cañavate, J. P. (2008). Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of cytosolic HSP90 genes in the flatfish *Senegalese sole* (*Solea senegalensis* Kaup). *Gene*, 416, 77-84.
- Mandiki, S. N. M., Milla, S., Wang, N., Blanchard, G., Djonkack, T., Tanascaux, S., ... & Kestemont, P. (2011). Effects of probiotic bacteria on growth parameters and immune defence in Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. larvae under intensive culture conditions. *Aquaculture Research*, 42, 693-703.
- Manefield, M., Harris, L., Rice, S. A., de Nys, R., & Kjelleberg, S. (2000). Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (5), 2079-2084.
- Mao, Z., He, C., Qiu, Y., & Chen, J. (2011). Expression of *Vibrio harveyi* ompK in the yeast *Pichia pastoris*: The first step in developing an oral vaccine against vibriosis?. *Aquaculture*, 318 (3), 268-272.
- Martin-Antonio, B., Manchado, M., Infante, C., Zerolo, R., Labella, A., Alonso, C., ... & Borrego, J. J. (2007). Intestinal microbiota variation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) under different feeding regimes. *Aquaculture Research*, 38, 1213-1222.
- Martínez, G., Shaw, E.M., Carrillo, M., & Zanuy, S. (1998) Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *Biotechniques*, 24, 238-239.
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Hermosillo, O. A., & Ramírez Saad, H. C. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiology*, 2012.
- Martínez-Hidalgo, P., Galindo-Villardón, P., Igual, J. M., & Martínez-Molina, E. (2014). Micromonospora from nitrogen fixing nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). A new promising plant probiotic bacteria. *Scientific Reports*, 4, 6389.
- Marzorati M, Wittebolle L, Boon N, Daffonchio D & Verstraete W, (2008). How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology*, 10, 1571-1581.
- Matsuura, Y., Takasaki, M., Miyazawa, R., & Nakanishi, T. (2017). Stimulatory effects of heat-killed *Enterococcus faecalis* on cell-mediated immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 74, 1-9.

- Mauri, I., Romero, A., Acerete, L., MacKenzie, S., Roher, N., Callol, A., ... & Tort, L. (2011). Changes in complement responses in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) under crowding stress, plus viral and bacterial challenges. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(1), 182-188.
- McCall, J. O., & Sizemore, R. K. (1979). Description of a bacteriocinogenic plasmid in *Beneckea harveyi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 38, 974-979.
- McGonigle S., Dalton J.P. & James E.R. (1998) Peroxidoxins: A New Antioxidant Family. *Trends in Parasitology*, 14,139-145.
- McIntosh, D., & Austin, B. (1996). The validity of Western blotting for the diagnosis of bacterial kidney disease based on the detection of the p57 antigen of *Renibacterium salmoninarum*. *Journal of microbiological methods*, 25(3), 329-335.
- Mehrim, A. I. (2009). Effect of dietary supplementation of Biogen® (Commercial probiotic) on mono-sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under different stocking densities. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 4 (6), 261-273.
- Merghni, A., Leban, N., Behi, A., & Bakhruf, A. (2014). Evaluation of the probiotic properties of *Bacillus* spp. strains isolated from Tunisian hypersaline environments. *African Journal of Microbiology Research*, 8(4), 398-405.
- Merino, S., Aguilar, A., Nogueras, M. M., Regue, M., Swift, S., & Tomás, J. M. (1999). Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O: 34. *Infection and Immunity*, 67, 4008-4013.
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T., Bøggwald, J., ... & Ringø, E. (2010a). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302, 1-18.
- Merrifield, D. L., Harper, G. M., Dimitroglou, A., Ringø, E., & Davies, S. J. (2010b). Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquaculture Research*, 41, 1268-1272.
- Messi, P., Guerrieri, E., & Bondi, M. (2003). Bacteriocin-like substance (BLS) production in *Aeromonas hydrophila* water isolates. *FEMS Microbiology Letters*, 220, 121-125.
- Millán, L. M., & Pérez, J. C. F. (2017). Terapéutica en acuicultura. *Panorama Actual del Medicamento*, 41 (404), 579-588.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente [Internet]. *El mercado del lenguado en España*. Recuperado el 13 de junio de 2016 de http://www.mapama.gob.es/es/pesca/temas/mercados-economia-pesquera/informelenguadodic2015_tcm7-424489.pdf
- Minor, P. D. (2015). Live attenuated vaccines: historical successes and current challenges. *Virology*, 479, 379-392.
- Miyamoto, K., Kosakai, K., Ikebayashi, S., Tsuchiya, T., Yamamoto, S., & Tsujibo, H. (2009). Proteomic analysis of *Vibrio vulnificus* M2799 grown under iron-repleted and iron-depleted conditions. *Microbial Pathogenesis*, 46 (3), 171-177.
- Mladineo, I., Miletić, I., & Bočina, I. (2006). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* outbreak in cage-reared Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 18, 51-54.
- Mo, W. Y., Chen, Z., Leung, H. M., & Leung, A. O. W. (2017). Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks. *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (10), 8978-8989.
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A. K., Das, P., Paniprasad, K., & Mohanta, K. N. (2012). Use of different microbial probiotics in the diet of rohu, *Labeo rohita* fingerlings: effects on growth,

- nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora. *Aquaculture Nutrition*, 18, 1-11.
- Mok, K. C., Wingreen, N. S., & Bassler, B. L. (2003). *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *The EMBO journal*, 22 (4), 870-881.
- Montalban-Arques, A., De Schryver, P., Bossier, P., Gorkiewicz, G., Mulero, V., Gatlin III, D. M., & Galindo-Villegas, J. (2015). Selective manipulation of the gut microbiota improves immune status in vertebrates. *Frontiers in Immunology*, 6.
- Montero, A. B., & Austin, B. (1999). Characterization of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recovered from diseased post-larval *Penaeus vannamei* (Bonne). *Journal of Fish Diseases*, 22, 377-386.
- Montet, D., Le Nguyen, D. D., & Kouakou, A. C. (2012). Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of microbial communities by PCR-DGGE: An application on fish from different tropical origins. *Aquaculture*, 6, 93-108.
- Morais, S., Aragão, C., Cabrita, E., Conceição, L. E., Constenla, M., Costas, B., ... & Gisbert, E. (2014). New developments and biological insights into the farming of *Solea senegalensis* reinforcing its aquaculture potential. *Reviews in Aquaculture*.
- Moriarty, D. J. W. (1998). Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164, 351-358.
- Moro, E., Weiss, R. D. N., Friedrich, R. S., & Nunes, M. P. (1997). Bacteriocin-like Substance of *Aeromonas hydrophila*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92, 115-116.
- Moubareck, C., Gavini, F., Vaugien, L., Butel, M. J., & Doucet-Populaire, F. (2005). Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55, 38-44.
- Mulligan, C., Fischer, M., & Thomas, G. H. (2011). Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters in bacteria and archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 35, 68-86.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., van der Knaap, W. P., Mialhe, E., & Bachère, E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191, 89-107.
- Mutuloki, S., Reite, O. B., Brudeseth, B., Tverdal, A., & Evensen, Ø. (2006). A comparative immunopathological study of injection site reactions in salmonids following intraperitoneal injection with oil-adjuvanted vaccines. *Vaccine*, 24, 578-588.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695-700.

N

- Naka, H., Hirono, I., & Aoki, T. (2007). Cloning and characterization of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* phospholipase: an enzyme that shows haemolytic activity. *Journal of Fish Diseases*, 30(11), 681-690.
- Nakai, T., Fujiie, N., Muroga, K., Arimoto, M., Mizuta, Y. & Matsuoka, S. (1992). *Pasteurella piscicida* infection in hatchery-reared juvenile striped jack. *Fish Pathology*, 27, 103-108.
- Nakanishi, T., Kiryu, I., & Ototake, M. (2002). Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. *Vaccine*, 20(31), 3764-3769.

- National Office of Animal Health [Internet]. Responsible use of vaccines and vaccination in fish production. Recuperado el 16 de septiembre de 2016 de <http://www.ruma.org.uk/wp-content/uploads/2014/09/fish-vaccine-long.pdf>
- Natrah, F. M. I., Ruwandeepika, H. D., Pawar, S., Karunasagar, I., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2011). Regulation of virulence factors by quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Veterinary microbiology*, *154* (1), 124-129.
- Navarrete, P., Espejo, R. T., & Romero, J. (2009). Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Microbial Ecology*, *57* (3), 550.
- Navarrete, P., Fuentes, P., la Fuente, L., Barros, L., Magne, F., Opazo, R., ... & Romero, J. (2013). Short-term effects of dietary soybean meal and lactic acid bacteria on the intestinal morphology and microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Nutrition*, *19* (5), 827-836.
- Nayak, S. K., Swain, P., & Mukherjee, S. C. (2007). Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish & Shellfish Immunology*, *23*(4), 892-896.
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, *41*(11), 1553-1573.
- Neuman, C., Hatje, E., Zarkasi, K. Z., Smullen, R., Bowman, J. P., & Katouli, M. (2016). The effect of diet and environmental temperature on the faecal microbiota of farmed Tasmanian Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*, *47* (2), 660-672.
- Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A. A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J., & Austin, B. (2007). *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, *103*, 1699-1706
- Newaj-Fyzul, A., & Austin, B. (2014). Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. *Journal of Fish Diseases*. *38*, 937-955.
- Ngamkala, S., Futami, K., Endo, M., Maita, M., & Katagiri, T. (2010). Immunological effects of glucan and *Lactobacillus rhamnosus* GG, a probiotic bacterium, on Nile tilapia *Oreochromis niloticus* intestine with oral *Aeromonas* challenges. *Fisheries Science*, *76* (5), 833-840.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., Bylund, G. (2001). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, *198*, 229-236.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Bylund, G., Salminen, S., & Lilius, E. M. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish & Shellfish Immunology*, *15*, 443-452.
- Nilsson, L., Ng, Y. Y., Christiansen, J. N., Jørgensen, B. L., Grotinum, D., & Gram, L. (2004). The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *Journal of Applied Microbiology*, *96*, 133-143.
- Ningqiu, L., Junjie, B., Shuqin, W., Xiaozhe, F., Haihua, L., Xing, Y., & Cunbin, S. (2008). An outer membrane protein, OmpK, is an effective vaccine candidate for *Vibrio harveyi* in Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & Shellfish Immunology*, *25*(6), 829-833.
- Nishimori, E., Hasegawa, O., Numata, T. & Wakabayashi, H. (1998) *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. *Fish Pathology*, *33*, 495-502.
- Norqvist, A., Hagström, Å., & Wolf-Watz, H. (1989). Protection of rainbow trout against vibriosis and furunculosis by the use of attenuated strains of *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, *55*, 1400-1405.

O

- Obeidat, M. (2017). Isolation and characterization of extremely halotolerant *Bacillus* species from Dead Sea black mud and determination of their antimicrobial and hydrolytic activities. *African Journal of Microbiology Research*, 11(32), 1303-1314.
- Ogier de Baulny M., Quentel C., Fournier V., Lamour F., & Le Gouvello R. (1996) Effect of long-term oral administration of β -glucan as an immunostimulant or an adjuvant on non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 26, 139-147.
- Oldham, M. L., Chen, S., & Chen, J. (2013). Structural basis for substrate specificity in the *Escherichia coli* maltose transport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (45), 18132-18137.
- Olsen, R. E., Sundell, K., Hansen, T., Hemre, G. I., Myklebust, R., Mayhew, T. M., & Ringø, E. (2002). Acute stress alters the intestinal lining of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: An electron microscopical study. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(3), 211-221.
- Olveira, J. G., Soares, F., Engrola, S., Dopazo, C. P., & Bandín, I. (2008). Antemortem versus postmortem methods for detection of betanodavirus in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 215-219.
- Onishi, K., Jo, Y., & Watanabe, K. (1982). *Pasteurella* infection in young black seabream. *Fish Pathology*, 16, 207-210.
- Ordás, M. C., Cuesta, A., Mercado, L., Bols, N. C., & Tafalla, C. (2011). Viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) up-regulates the cytotoxic activity and the perforin/granzyme pathway in the rainbow trout RTS11 cell line. *Fish & Shellfish Immunology*, 31 (2), 252-259.
- Organización Mundial de la Salud (2006). Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. *Report of a Joint FAO/OIE/WHO Expert Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance*, 5-17.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2005). Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture. FAO, Rome.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [Internet]. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Recuperado el 13 de junio de 2016 de <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>
- Ortuño, J., Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M. A., & Meseguer, J. (2002). Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 85, 41-50.
- Osuna-Jiménez, I., Williams, T. D., Prieto-Álamo, M. J., Abril, N., Chipman, J. K., & Pueyo, C. (2009). Immune- and stress-related transcriptomic responses of *Solea senegalensis* stimulated with lipopolysaccharide and copper sulphate using heterologous cDNA microarrays. *Fish & Shellfish Immunology*, 26, 699-706.
- Owens, L., Austin, D. A., & Austin, B. (1996). Effect of strain origin on siderophore production in *Vibrio harveyi* isolates. *Diseases of Aquatic Organisms*, 27, 157-160.

P

- Pai, S. S., Anas, A., Jayaprakash, N. S., Priyaja, P., Sreelakshmi, B., Preetha, R., & Singh, I. S. B. (2010). *Penaeus monodon* larvae can be protected from *Vibrio harveyi* infection by pre-emptive treatment of a rearing system with antagonistic or non-antagonistic bacterial probiotics. *Aquaculture Research*, *41*, 847-860.
- Paillard, C., Allam, B., & Oubella, R. (2004). Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, *59*(3), 249-262.
- Paillard, C., Korsnes, K., Le Chevalier, P., Le Boulay, C., Harkestad, L., Eriksen, A. G., ... & Mortensen, S. (2008). *Vibrio tapetis*-like strain isolated from introduced Manila clams *Ruditapes philippinarum* showing symptoms of brown ring disease in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms*, *81*(2), 153-161.
- Palermo, F. A., Mosconi, G., Avella, M. A., Carnevali, O., Verdenelli, M. C., Cecchini, C., & Polzonetti-Magni, A. M. (2011). Modulation of cortisol levels, endocannabinoid receptor 1A, proopiomelanocortin and thyroid hormone receptor alpha mRNA expressions by probiotics during sole (*Solea solea*) larval development. *General and Comparative Endocrinology*, *171* (3), 293-300.
- Paineau, D., Carcano, D., Leyer, G., Darquy, S., Alyanakian, M. A., Simoneau, G., ... & Ouwehand, A. C. (2008). Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized, controlled trial. *Pathogens and Disease*, *53*(1), 107-113.
- Pan, X., Wu, T., Song, Z., Tang, H., & Zhao, Z. (2008). Immune responses and enhanced disease resistance in Chinese drum, *Miichthys miiuy* (Basilewsky), after oral administration of live or dead cells of *Clostridium butyricum* CB2. *Journal of Fish Diseases*, *31*, 679-686.
- Pandiyani, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E. G. J., Subaramaniyan, K., Manikkam, S., & Sadayappan, B. (2013). Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today*, *5* (1), 55-59.
- Pang, H. Y., Li, Y., Wu, Z. H., Jian, J. C., Lu, Y. S., & Cai, S. H. (2010). Immunoproteomic analysis and identification of novel immunogenic proteins from *Vibrio harveyi*. *Journal of Applied Microbiology*, *109*, 1800-1809.
- Panigrahi, A., & Azad, I. S. (2007). Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario. *Fish Physiology and Biochemistry*, *33*, 429-440.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., ... & Aoki, T. (2007). Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Developmental & Comparative Immunology*, *31*(4), 372-382.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., & Watanabe, T. (2010). Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish Physiology and Biochemistry*, *36*, 969-977.
- Panigrahi, A., Viswanath, K., & Satoh, S. (2011). Real-time quantification of the immune gene expression in rainbow trout fed different forms of probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture Research*, *42*(7), 906-917.
- Parra, D., Reyes-Lopez, F. E., & Tort, L. (2015). Mucosal immunity and B cells in teleosts: effect of vaccination and stress. *Frontiers in Immunology*, *6*.
- Pasnik, D. J., & Smith, S. A. (2005). Immunogenic and protective effects of a DNA vaccine for *Mycobacterium marinum* in fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *103*, 195-206.
- Pass, D. A., Dybdahl, R., & Mannion, M. M. (1987). Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in western Australia. *Aquaculture*, *65*, 149-169.

- Passet, V., & Brisse, S. (2015). Association of tellurite resistance with hypervirulent clonal groups of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 53 (4), 1380-1382.
- Patra, S. K., & Mohamed, K. S. (2003). Enrichment of *Artemia nauplii* with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. *Aquaculture International*, 11, 505-514.
- Peiren, J., Buyse, J., De Vos, P., Lang, E., Clermont, D., Hamon, S., ... & Macián, M. C. (2015). Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(8), 3559-3571.
- Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J. L., Merrifield, D. L., Carnevali, O., Gioacchini, G., de Blas, I., & Ruiz-Zarzuela, I. (2011). Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(2), 196-201.
- Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., Blas, I., & Balcázar, J. L. (2014). Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Reviews in Aquaculture*, 6, 133-146.
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature reviews. Immunology*, 14(3), 141.
- Peso-Echarri, P., Frontela-Saseta, C., González-Bermúdez, C. A., Ros-Berruezo, G. F., & Martínez-Graciá, C. (2012). Polisacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: alginato, carragenato y ulvano. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 47(3), 373-381.
- Picchietti, S., Fausto, A. M., Randelli, E., Carnevali, O., Taddei, A. R., Buonocore, F., Scapigliati, G., ... & Abelli, L. (2009). Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 26, 368-376.
- Pieters, N., Brunt, J., Austin, B., & 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.
- Pirarat, N., Pinpimai, K., Endo, M., Katagiri, T., Ponpornpisit, A., Chansue, N., ... & Maita, M. (2011). Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Research in Veterinary Science*, 91, 92-97.
- Pfaffl, M. (2001). Development and validation of an externally standardised quantitative insulin-like growth factor-1 RT-PCR using LightCycler SYBR Green I technology. In *Rapid Cycle Real-Time PCR* (pp. 281-291). Heidelberg: Springer Berlin.
- Planas, M., Vázquez, J. A., Marqués, J., Pérez-Lomba, R., González, M., & Murado, M. (2004). Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture*, 240, 313-329.
- Plant, K. P., & LaPatra, S. E. (2011). Advances in fish vaccine delivery. *Developmental & Comparative Immunology*, 35, 1256-1262.
- Plumbridge, J., & Vimr, E. (1999). Convergent pathways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181(1), 47-54.
- Pooramini, M., Kamali, A., Hajimoradloo, A., Alizadeh, M., & Ghorbani, R. (2009). Effect of using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as probiotic on growth parameters, survival and carcass quality in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry. *International Aquatic Research*, 1 (1), 39-44.
- Powell, A., Pope, E. C., Eddy, F. E., Roberts, E. C., Shields, R. J., Francis, M. J., ... & Rowley, A. F. (2011). Enhanced immune defences in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) post-exposure to a vibrio vaccine. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107 (2), 95-99.

- Prasad, S., Manasa, P., Buddhi, S., Tirunagari, P., Begum, Z., Rajan, S., & Shivaji, S. (2014). Diversity and bioprospective potential (cold-active enzymes) of cultivable marine bacteria from the subarctic glacial fjord, Kongsfjorden. *Current Microbiology*, 68(2), 233-238.
- Prasad, S., Morris, P. C., Hansen, R., Meaden, P. G., & Austin, B. (2005). A novel bacteriocin-like substance (BLIS) from a pathogenic strain of *Vibrio harveyi*. *Microbiology*, 151, 3051-3058.
- Prayitno, S. B., & Latchford, J. W. (1995). Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture*, 132 (1), 105-112.
- Press, C. M., & Lillehaug, A. (1995). Vaccination in European salmonid aquaculture: a review of practices and prospects. *British Veterinary Journal*, 151, 45-69.
- Prieto-Álamo, M. J., Abril, N., Osuna-Jiménez, I., & Pueyo, C. (2009). *Solea senegalensis* genes responding to lipopolysaccharide and copper sulphate challenges: large-scale identification by suppression subtractive hybridization and absolute quantification of transcriptional profiles by real-time RT-PCR. *Aquatic Toxicology*, 91, 312-319.
- Pujalte, M. J., Sitja-Bobadilla, A., Macián, M. C., Belloch, C., Alvarez-Pellitero, P., Perez-Sanchez, J., & Garay, E. (2003). Virulence and molecular typing of *Vibrio harveyi* strains isolated from cultured dentex, gilthead sea bream and European sea bass. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 284-292.

Q

- Qadri, F., Chowdhury, A., Hossain, J., Chowdhury, K., Azim, T., Shimada, T., & Albert, M. J. (1994). Development and evaluation of rapid monoclonal antibody-based coagglutination test for direct detection of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal in stool samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 1589-1590.
- Quesada-Herrera, M., Pozo, J., & Placencia, R. (2004) Selección de probióticos bacterianos para su uso en el cultivo de camarón. In III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. Comunicación Técnica. Recuperado el 13 de junio de 2016 de: <http://myslide.es/documents/seleccion-de-probioticos-bacterianos-para-uso-en-cultivo-camaron.html>

R

- Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71 (1), 635-700.
- Raida, M. K., & Buchmann, K. (2008). Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: effects of temperature on protection and gene expression. *Vaccine*, 26 (8), 1050-1062.
- Ramesh, D., Vinothkanna, A., Rai, A. K., & Vignesh, V. S. (2015). Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 45 (2), 268-276.
- Rakers, S., Gebert, M., Uppalapati, S., Meyer, W., Maderson, P., Sell, A. F., & Paus, R. (2010). 'Fish matters': the relevance of fish skin biology to investigative dermatology. *Experimental Dermatology*, 19, 313-324.

- Ramirez, R. F., & Dixon, B. A. (2003). Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscar (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture*, 227, 417-426.
- Ramos, M. A., Weber, B., Gonçalves, J. F., Santos, G. A., Rema, P., & Ozório, R. O. A. (2013). Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 166(2), 302-307.
- Rattanachuy, P., Kantachote, D., Tantirungkij, M., Nitoda, T., & Kanzaki, H. (2010). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by extracellular compounds from a proteolytic bacterium *Pseudomonas* sp. W3. *Electronic journal of biotechnology*, 13, 8-9.
- Ratti, C. (2001). Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering*, 49, 311-319.
- Ravi, A. V., Musthafa, K. S., Jegathammbal, G., Kathiresan, K., & Pandian, S. K. (2007). Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic Vibrios in marine aquaculture. *Letters in Applied Microbiology*, 45 (2), 219-223.
- Rawls, J. F., Samuel, B. S., & Gordon, J. I. (2004). Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), 4596-4601.
- Ray A.K., Ghosh K., & Ringø E. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*, 18, 465-492.
- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero de 2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia
- Reglamento (CE) nº 429/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de abril de 2008, sobre normas de desarrollo para la aplicación del Reglamento (CE) nº 1831/2003.
- Reglamento CE) nº 508/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de mayo de 2014, relativo al Fondo Europeo Marítimo y de Pesca.
- Reglamento (CE) nº 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal.
- Ren, P., Xu, L., Yang, Y., He, S., Liu, W., Ringø, E., & Zhou, Z. (2013). *Lactobacillus planarum* subsp. *plantarum* JCM 1149 vs. *Aeromonas hydrophila* NJ-1 in the anterior intestine and posterior intestine of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis aureus* ♂: An ex vivo study. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(1), 146-153.
- Rendón, L., y Balcázar, J. L. (2003). Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC*, 19, 27-33.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., & Menasaveta, P. (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191, 271-288.
- Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramírez, D., Ascencio-Valle, F., Civera-Cerecedo, R., Gracia-López, V., Barbosa-Solomieu, V., & Esteban, M. Á. (2011). Effects of dietary supplementation with probiotic live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant systems of leopard grouper *Mycteroperca rosacea* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 42 (11), 1676-1686.
- Richardson R., Dunman P. M. & Fang F. C. (2006). The nitrosative stress response of *Staphylococcus aureus* is required for resistance to innate immunity. *Molecular Microbiology* 61, 927-939.

- Rico, R. M., Tapia-Paniagua, S., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M. C., & Moriñigo, M. A. (2008). Characterization of *Vibrio harveyi* strains recovered from diseased farmed *Senegalese sole* (*Solea senegalensis*). *Journal of Applied Microbiology*, *105*, 752-760.
- Rico-Mora, R., Voltolina, D., & Villaescusa-Celaya, J. A. (1998). Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (*Bacillariophyceae*) cultures. *Aquacultural Engineering*, *19*, 1-6.
- Ridgway, I. D., Small, H. J., Atkinson, R. J. A., Birkbeck, H. T., Taylor, A. C., & Neil, D. M. (2008). Extracellular proteases and possible disease related virulence mechanisms of two marine bacteria implicated in an opportunistic bacterial infection of *Nephrops norvegicus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *99*, 14-19.
- Ridha, M. T., & Azad, I. S. (2012). Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* supplemented with two putative probiotic bacteria. *Aquaculture Research*, *43* (6), 843-852.
- Rigos, G., & Katharios, P. (2010). Pathological obstacles of newly-introduced fish species in Mediterranean mariculture: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, *20*, 47-70.
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Reviews in Microbiology*, *56*(1), 117-137.
- Ringø, E., Olsen, R. E., Mayhew, T. M., & Myklebust, R. (2003). Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture*, *227*(1-4), 395-415.
- Ringø, E., Salinas, I., Olsen, R. E., Nyhaug, A., Myklebust, R., & Mayhew, T. M. (2007). Histological changes in intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following in vitro exposure to pathogenic and probiotic bacterial strains. *Cell and Tissue Research*, *328*, 109-116.
- Ringø, E., Løvmo, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, I., Myklebust, R., ... & Mayhew, T. M. (2010). Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture research*, *41*, 451-467.
- Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S., & Ouwehand, A. C. (2003). Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization?. *Veterinary Microbiology*, *92*, 111-119.
- Rizzardini, G., Eskesen, D., Calder, P. C., Capetti, A., Jespersen, L., & Clerici, M. (2012). Evaluation of the immune benefits of two probiotic strains *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, BB-12® and *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, L. casei 431® in an influenza vaccination model: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *British Journal of Nutrition*, *107*(6), 876-884.
- Robertson, P.A.W., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J.R., Zherdmant, M. & Austin, B. (1998). Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*. *32*, 151-155.
- Rodríguez-Ortega, M. J., Norais, N., Bensi, G., Liberatori, S., Capo, S., Mora, M., & Grandi, G. (2006). Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A *Streptococcus* surface proteome. *Nature Biotechnology*, *24*, 191-197.
- Romalde, J. L., & Magariños, B. (1997). Immunization with bacterial antigens: pasteurellosis. *Developments in Biological Standardization*, *90*, 167-177.
- Romalde, J. L. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, *5*, 3-9.
- Román, L., Real, F., Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, B., Grasso, V., ... & Acosta, F. (2012). The in vitro effect of probiotic *Vagococcus fluvialis* on the innate immune parameters of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology*, *33* (5), 1071-1075.

- Román, L., Real, F., Padilla, D., El Aamri, F., Déniz, S., Grasso, V., & Acosta, F. (2013). Cytokine expression in head-kidney leucocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) after incubation with the probiotic *Vagococcus fluvialis* L-21. *Fish & Shellfish Immunology*, 35 (4), 1329-1332.
- Romarheim, O. H., Landsverk, T., Mydland, L. T., Skrede, A., & Øverland, M. (2013). Cell wall fractions from *Methylococcus capsulatus* prevent soybean meal-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 402, 13-18.
- Rombout, J. H., Abelli, L., Picchietti, S., Scapigliati, G., & Kiron, V. (2011). Teleost intestinal immunology. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(5), 616-626.
- Rosas-Ledesma, P., León-Rubio, J. M., Alarcón, F. J., Moriñigo, M. A., & Balebona, M. C. (2012). Calcium alginate capsules for oral administration of fish probiotic bacteria: assessment of optimal conditions for encapsulation. *Aquaculture Research*, 43 (1), 106-116.
- Ruby, E. G., & Morin, J. G. (1978). Specificity of symbiosis between deep-sea fishes and psychrotrophic luminous bacteria. *Deep Sea Research*, 25, 161-167.
- Ruiz-Garcia, C., Quesada, E., Martinez-Checa, F., Llamas, I., Urdaci, M. C., & Béjar, V. (2005). *Bacillus axarquiensis* sp. nov. and *Bacillus malacitensis* sp. nov., isolated from river-mouth sediments in southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), 1279-1285.
- Ruwandepika, H. A., Bhowmick, P. P., Karunasagar, I., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2011). Quorum sensing regulation of virulence gene expression in *Vibrio harveyi* in vitro and in vivo during infection of gnotobiotic brine shrimp larvae. *Environmental Microbiology Reports*, 3(5), 597-602.

S

- Sáenz de Rodrigáñez M., Alarcón F.J., Martínez M.I., Ruiz F., Díaz M. & Moyano F.J. (2005) Caracterización de las proteasas digestivas del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, 21, 95–104.
- Saha, A. K., Dowling, J. N., LaMarco, K. L., Das, S., Remaley, A. T., Olomu, N., ... & Glew, R. H. (1985). Properties of an acid phosphatase from *Legionella micdadei* which blocks superoxide anion production by human neutrophils. *Archives of biochemistry and biophysics*, 243 (1), 150-160.
- Sahoo, T. K., Jena, P. K., Patel, A. K., & Seshadri, S. (2014). Bacteriocins and their applications for the treatment of bacterial diseases in aquaculture: a review. *Aquaculture Research*, 1, 1-15.
- Sahu, M. K., Swarnakumar, N. S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., & Kannan, L. (2008). Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian Journal of Microbiology*, 48 (3), 299-308.
- Saint-Cyr, M. J., Guyard-Nicodème, M., Messaoudi, S., Chemaly, M., Cappelier, J. M., Dousset, X., & Haddad, N. (2016). Recent advances in screening of anti-Campylobacter activity in probiotics for use in poultry. *Frontiers in Microbiology*, 7, 553.
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172 (1-2), 63-92.
- Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martín-Antonio, B., Crespo, D., Planas, J. V., Infante, C., & Machado, M. (2010). Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): potential effects on the immune response. *Fish & Shellfish Immunology*, 28, 296-302.

- Salinas, I., Cuesta, A., Esteban, M. Á., & Meseguer, J. (2005). Dietary administration of *Lactobacillus delbrückii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 19 (1), 67-77.
- Salinas, I., Díaz-Rosales, P., Cuesta, A., Meseguer, J., Chabrilón, M., Morinigo, M. A., & Esteban, M. A. (2006). Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 111, 279-286.
- Salinas, I., Abelli, L., Bertoni, F., Picchiatti, S., Roque, A., Furones, D., & Esteban, M. Á. (2008). Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 114-123
- Salonius, K., Siderakis, C., MacKinnon, A. M., & Griffiths, S. G. (2005). Use of *Arthrobacter davidanieli* as a live vaccine against *Renibacterium salmoninarum* and *Piscirickettsia salmonis* in salmonids. *Developments in Biologicals*, 121, 189-197.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanguinetti, C. J., Dias, N. E., & Simpson, A. J. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17, 914-921.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., & Foerst, P. (2006). Effect of carbohydrates on the survival of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 271-276.
- Saxena, S., Samala, G., Sridevi, J. P., Devi, P. B., Yogeewari, P., & Sriram, D. (2015). Design and development of novel *Mycobacterium tuberculosis*-alanine dehydrogenase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 92, 401-414.
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1-17.
- Schrijver, R., & Ollevier, F. (2000). Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture*, 186 (1), 107-116.
- Secombes, C. (2008). Will advances in fish immunology change vaccination strategies? *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 409-416.
- Selvaraj V., Sampath K., & Sekar V. (2006) Adjuvant and immunostimulatory effects of β -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenge with *Aeromonas hydrophila*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114, 15-24.
- Sganga, G., Cozza, V., Spanu, M. D., Spada, P. L., & Fadda, G. (2009). Global climate change and wound care: case study of an off-season *Vibrio alginolyticus* infection in a healthy man. *Ostomy Wound Management*, April 2009, 60-62.
- Shand R.F., & Leyva K.J. (2008) Archaeal antimicrobials: an undiscovered country. In: Blum P. (Ed) *Archaea: new models for prokaryotic biology* (pp. 233–242). Norfolk: Caister Academic.
- Shannon, C. E., & Weaver, W. (1949). The mathematical theory of communication. *Urbana: University of Illinois Press*.
- Sharifuzzaman, S. M., & Austin, B. (2010). *Kocuria* SM1 controls vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 108, 2162-2170
- Sharifuzzaman, S. M., Abbass, A., Tinsley, J. W., & Austin, B. (2011). Subcellular components of probiotics *Kocuria* SM1 and *Rhodococcus* SM2 induce protective immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) against *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(1), 347-353.

- Sharifuzzaman, S. M., Al-Harbi, A. H., & Austin, B. (2014). Characteristics of growth, digestive system functionality, and stress factors of rainbow trout fed probiotics *Kocuria* SM1 and *Rhodococcus* SM2. *Aquaculture*, 418, 55-61.
- Sharma, O. P., & Bhukar, S. K. S. (2000). Effect of Aquazyn-TM-1000, a probiotic on the water quality and growth of *Cyprinus carpio* var. *communis* (L.). *Indian Journal of Fisheries*, 47, 209-213.
- Shau, H., Gupta, R. K., & Golub, S. H. (1993). Identification of a natural killer enhancing factor (NKEF) from human erythroid cells. *Cellular Immunology*, 147, 1-11.
- Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S., & Myers, R. M. (1989). Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 232-236.
- Shehane, S. D., & Sizemore, R. K. (2002). Isolation and preliminary characterization of bacteriocins produced by *Vibrio vulnificus*. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 322-328.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68 (5), 850-858.
- Shiu, Y. L., Chiu, K. H., Huynh, T. G., Liu, P. C., & Liu, C. H. (2017). Plasma immune protein analysis in the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*: Evidence for altered expressions of immune factors associated with a choline-supplemented diet. *Fish & Shellfish Immunology*, 65, 235-243.
- Shoemaker, C. A., Klesius, P. H., & Bricker, J. M. (1999). Efficacy of a modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine in channel catfish as young as seven days post hatch. *Aquaculture*, 176, 189-193.
- Shoemaker, C. A., Klesius, P. H., & Evans, J. J. (2007). Immunization of eyed channel catfish, *Ictalurus punctatus*, eggs with monovalent *Flavobacterium columnare* vaccine and bivalent *F. columnare* and *Edwardsiella ictaluri* vaccine. *Vaccine*, 25, 1126-1131.
- Sieladie, D. V., Zambou, N. F., Kaktcham, P. M., Cresci, A., & Fonteh, F. (2011). Probiotic properties of lactobacilli strains isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 9, 12.
- Skala Maskon. [Internet]. High speed vaccination. Recuperado el 1 de noviembre de 2015 de: http://skalamaskon.no/maskon_eng/Aquaculture/High-Speed-Vaccination
- Skjermo, J., & Bergh, Ø. (2004). High-M alginate immunostimulation of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae using *Artemia* for delivery, increases resistance against vibriosis. *Aquaculture*, 238, 107-113.
- Small, H. J., Shields, J. D., Neil, D. M., Taylor, A. C., & Coombs, G. H. (2007). Differences in enzyme activities between two species of *Hematodinium*, parasitic dinoflagellates of crustaceans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94, 175-183.
- Snieszko, S. F., Bullock, G. L., Hollis, E., & Boone, J. G. (1964). *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *Journal of Bacteriology*, 88, 1814.
- Snoussi, M., Hajlaoui, H., Noumi, E., Zanetti, S., & Bakhrouf, A. (2008). Phenotypic and molecular characterization of *Vibrio alginolyticus* strains recovered from juveniles and older *Sparus aurata* reared in a Tunisian marine farm. *Annals Microbiology*, 58, 141-146.
- Soares, R., Franco, C., Pires, E., Ventosa, M., Palhinhas, R., Koci, K., ... & Coelho, A. V. (2012). Mass spectrometry and animal science: protein identification strategies and particularities of farm animal species. *Journal of Proteomics*, 75 (14), 4190-4206.

- Soffientino, B., Gwaltney, T., Nelson, D. R., Specker, J. L., Mauel, M., & Gomez-Chiarri, M. (1999). Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carachariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture. *Diseases of Aquatic Organisms*, 38 (3), 201-210.
- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., & Frost, P. (2005). Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*, 4, 89.
- Son, V. M., Chang, C. C., Wu, M. C., Guu, Y. K., Chiu, C. H., & 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., & 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 Science B*, 7, 596-602.
- Song-Lin, G., Jian-Jun, F., Qiu-Hua, Y., Rui-Zhang, G., Yu, W., & Pan-Pan, L. (2014). Immune effects of bathing European eels in live pathogenic bacteria, *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 45(5), 913-921.
- Soni, D., Smoum, R., Breuer, A., Mechoulam, R., & Steinberg, D. (2015). Effect of the synthetic cannabinoid HU-210 on quorum sensing and on the production of quorum sensing-mediated virulence factors by *Vibrio harveyi*. *BMC Microbiology*, 15 (1), 159.
- Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, F., Román, L., Grasso, V., Vega, J., & 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 (2), 369-373.
- Sorroza, L., Real, F., Acosta, F., Acosta, B., Déniz, S., Román, L., ... & Padilla, D. (2013). A probiotic potential of *Enterococcus gallinarum* against *Vibrio anguillarum* infection. *Fish Pathology*, 48 (1), 9-12.
- Soto, E., Brown, N., Gardenfors, Z. O., Yount, S., Revan, F., Francis, S., ... & Camus, A. (2014). Effect of size and temperature at vaccination on immunization and protection conferred by a live attenuated *Francisella noatunensis* immersion vaccine in red hybrid tilapia. *Fish & Shellfish Immunology*, 41 (2), 593-599.
- Soto-Rodríguez, S. A., Roque, A., Lizarraga-Partida, M. L., Guerra-Flores, A. L., & Gomez-Gil, B. (2003). Virulence of luminous vibrios to artemia *Franciscana nauplii*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 53 (3), 231-240.
- Soto-Rodríguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano, R., del Rio-Rodríguez, R., Diéguez, A. L., & Romalde, J. L. (2012). Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the "Bright-red" Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109, 307-317.
- Sotomayor, M. A., & Balcazar, J. L. (2003). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by mixture of probiotic strain. *Reviews in Aquatic Science*, 19, 9-15.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Sick, E. B., Pipper, C. B., Martinussen, T., & Gram, L. (2001). The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environmental Microbiology*, 3, 755-765.
- Standen, B. T., Peggs, D. L., Rawling, M. D., Foey, A., Davies, S. J., Santos, G. A., & Merrifield, D. L. (2016). Dietary administration of a commercial mixed-species probiotic improves growth performance and modulates the intestinal immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 49, 427-435.
- Standen, B. T., Rawling, M. D., Davies, S. J., Castex, M., Foey, A., Gioacchini, G., & Merrifield, D. L. (2013). Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal-and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 35, 1097-1104.

- Stavrínides, J., McCann, H. C., & Guttman, D. S. (2008). Host–pathogen interplay and the evolution of bacterial effectors. *Cellular Microbiology*, 10(2), 285-292.
- Stein, M. A., McAllister, S. A., Johnston, K. H., & Diedrich, D. L. (1990). Detection of lipopolysaccharides blotted to polyvinylidene difluoride membranes. *Analytical Biochemistry*, 188(2), 285-287.
- Stevens, C. H., Croft, D. P., Paull, G. C., & Tyler, C. R. (2017). Stress and welfare in ornamental fishes: what can be learned from aquaculture?. *Journal of Fish Biology*, 91 (2), 409-428.
- Stewart, A. J., & Devlin, P. M. (2006). The history of the smallpox vaccine. *Journal of Infection*, 52 (5), 329-334.
- Stoffels, G., Nes, I. F., & Guomundsdóttir, A. (1992). Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *Journal of Applied Bacteriology*, 73, 309-316.
- Strbo, N., & Podack, E. R. (2008). Secreted Heat Shock Protein gp96-Ig: An Innovative Vaccine Approach. *American Journal of Reproductive Immunology*, 59(5), 407-416.
- Su, J. H., Chang, M. C., Lee, Y. S., Tseng, I. C., & Chuang, Y. C. (2004). Cloning and characterization of the lipase and lipase activator protein from *Vibrio vulnificus* CKM-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1678, 7-13.
- Su, Z., Li, Y., Pan, L., & Zhang, J. (2017). Identification and real-time qPCR quantification of a nitrite-N degrading bacterial strain in aquatic water. *Aquaculture Research*, 48(7), 3657-3668.
- Sugita, H., Matsuo, N., Hirose, Y., Iwato, M., & Deguchi, Y. (1997). *Vibrio* sp. strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4986-4989.
- Sugita, H., Okano, R., Suzuki, Y., Iwai, D., Mizukami, M., Akiyama, N., & Matsuura, S. (2002). Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fisheries Science*, 68, 1004-1011.
- Sugita, H., & Ito, Y. (2006). Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin. *Letters in Applied Microbiology*, 43(3), 336-342.
- Sun, K., Zhang, W. W., Hou, J. H., & Sun, L. (2009). Immunoprotective analysis of VhhP2, a *Vibrio harveyi* vaccine candidate. *Vaccine*, 27 (21), 2733-2740.
- Sun, Y. Z., Yang, H. L., Ma, R. L., & Lin, W. Y. (2010). Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29, 803-809.
- Sun, Y. Z., Yang, H. L., Ma, R. L., Song, K., & Lin, W. Y. (2011). Molecular analysis of autochthonous microbiota along the digestive tract of juvenile grouper *Epinephelus coioides* following probiotic *Bacillus pumilus* administration. *Journal of Applied Microbiology*, 110(4), 1093-1103.
- Sun, Y. Z., Yang, H. L., Ma, R. L., Huang, K. P., & Ye, J. D. (2012). Culture-independent characterization of the autochthonous gut microbiota of grouper *Epinephelus coioides* following the administration of probiotic *Enterococcus faecium*. *Aquaculture international*, 20 (4), 791-801.
- Sung, Y. Y., & MacRae, T. H. (2011). Heat shock proteins and disease control in aquatic organisms. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 2 (006).
- Sutherland, K. P., Porter, J. W., & Torres, C. (2004). Disease and immunity in Caribbean and Indo-Pacific zooxanthellate corals. *Marine Ecology Progress Series*, 266, 265-272.
- Sutherland, D. B., Suzuki, K., & Fagarasan, S. (2016). Fostering of advanced mutualism with gut microbiota by immunoglobulin A. *Immunological Reviews*, 270(1), 20-31.

- Suzuki, M., Yamamoto, T., Kawai, Y., Inoue, N., & Yamazaki, K. (2005). Mode of action of piscicocin CS526 produced by *Carnobacterium piscicola* CS526. *Journal of Applied Microbiology*, *98*, 1146-1151.
- Swain, P., Nayak, S. K., Sahu, A., Meher, P. K., & Mishra, B. K. (2003). High antigenic cross-reaction among the bacterial species responsible for diseases of cultured freshwater fishes and strategies to overcome it for specific serodiagnosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *26*(3), 199-211.
- Swan, C. M., Lindstrom, N. M., & Cain, K. D. (2008). Identification of a localized mucosal immune response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following immunization with a protein-hapten antigen. *Journal of Fish Diseases*, *31* (5), 383-393.

T

- Tafalla, C., Bøgwald, J., & Dalmo, R. A. (2013). Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. *Fish & Shellfish Immunology*, *35* (6), 1740-1750.
- Tafaghodi, M., Tabassi, S. A. S., & Jaafari, M. R. (2006). Induction of systemic and mucosal immune responses by intranasal administration of alginate microspheres encapsulated with tetanus toxoid and CpG-ODN. *International Journal of Pharmaceutics*, *319*, 37-43.
- Tagg, J. R., & Dierksen, K. P. (2003). Bacterial replacement therapy: adapting 'germ warfare' to infection prevention. *Trends in biotechnology*, *21* (5), 217-223.
- Tahiri, I., Desbiens, M., Benech, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Thibault, S., ... & Fliss, I. (2004). Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *International Journal of Food Microbiology*, *97*, 123-136.
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J. Y., Kim, S. M., Park, S. I., Yoshikawa, T., & Sakata, T. (2006). Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science*, *72*, 755-766.
- Tapia-Paniagua, S. T., Chabrillón, M., Díaz-Rosales, P., de la Banda, I. G., Lobo, C., Balebona, M. C., & Moriñigo, M. A. (2010). Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbial Ecology*, *60*(2), 310-319.
- Tapia-Paniagua, S. T., Díaz-Rosales, P., León-Rubio, J. M., de La Banda, I. G., Lobo, C., Alarcón, F. J., ... & Arijo, S. (2012). Use of the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on the culture of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) and gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture International*, *20*(6), 1025-1039.
- Tapia-Paniagua, S. T., Vidal, S., Lobo, C., Prieto-Álamo, M. J., Jurado, J., Cordero, H., & Moriñigo, M. A. (2014). The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease. *Fish & Shellfish Immunology*, *41*, 209-221.
- Tapia-Paniagua, S. T., Vidal, S., Lobo, C., de la Banda, I. G., Esteban, M. A., Balebona, M. C., & Morinigo, M. A. (2015). Dietary administration of the probiotic SpPdp11: effects on the intestinal microbiota and immune-related gene expression of farmed *Solea senegalensis* treated with oxytetracycline. *Fish & Shellfish Immunology*, *46* (2), 449-458.
- Taylor D. E. (1999) Bacterial tellurite resistance. *Trends in Microbiology* *7*, 114.
- Teles, M., MacKenzie, S., Boltana, S., Callol, A., & Tort, L. (2011). Gene expression and TNF-alpha secretion profile in rainbow trout macrophages following exposures to copper and bacterial lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, *30*, 340-346.

- Telli, G. S., Ranzani-Paiva, M. J. T., de Carla Dias, D., Sussel, F. R., Ishikawa, C. M., & Tachibana, L. (2014). Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. *Fish & Shellfish Immunology*, 39(2), 305-311.
- Ten Doeschate, K. I., & Coyne, V. E. (2008). Improved growth rate in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture*, 284, 174-179.
- Teo, J. W., Tan, T. M., & Poh, C. L. (2002). Genetic determinants of tetracycline resistance in *Vibrio harveyi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 1038-1045.
- Teo, J. W., Zhang, L. H., & Poh, C. L. (2003). Cloning and characterization of a novel lipase from *Vibrio harveyi* strain AP6. *Gene*, 312, 181-188.
- Thankappan, B., Ramesh, D., Ramkumar, S., Natarajaseenivasan, K., & Anbarasu, K. (2015). Characterization of *Bacillus* spp. From the Gastrointestinal Tract of *Labeo rohita*—Towards to Identify Novel Probiotics Against Fish Pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175, 340-353.
- Thomas, L. V., & Ockhuizen, T. (2012). New insights into the impact of the intestinal microbiota on health and disease: a symposium report. *British Journal of Nutrition*, 107(S1), S1-S13.
- Thompson, F. L., Iida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68 (3), 403-431.
- Thune, R. L., Fernandez, D. H., Hawke, J. P., & Miller, R. (2003). Construction of a safe, stable, efficacious vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57(1-2), 51-58.
- Titball, R. W., & Petrosino, J. F. (2007). *Francisella tularensis* genomics and proteomics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1105, 98-121.
- Tonheim, T. C., Bøgwald, J., & Dalmo, R. A. (2008). What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 1-18.
- Toranzo, A. E., Barja, J. L., & Hetrick, F. M. (1982). Survival of *Vibrio anguillarum* and *Pasteurella piscicida* in estuarine and fresh waters. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 2, 43-45.
- Toranzo, A. E., Casal, J. F., Figueras, A., Magarin, B., & Barja, J. L. (1991). Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture*, 99, 1-15.
- Toranzo, A. E., Magariños, B., & Romalde, J. L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246, 37-61.
- Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35, 1366-1375.
- Tovar-Ramírez, D., Mazurais, D., Gatesoupe, J. F., Quazuguel, P., Cahu, C. L., & Zambonino-Infante, J. L. (2010). Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 300 (1), 142-147.
- Travers, M. A., Basuyaux, O., Goïc, N. L., Huchette, S., Nicolas, J. L., Koken, M., & Paillard, C. (2008). Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Global Change Biology*, 15 (6), 1365-1376.
- Treasurer, J., & Cox, C. (2008). Intraperitoneal and dorsal median sinus vaccination effects on growth, immune response, and reproductive potential in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture*, 275, 51-57.
- Tukmechi, A., Morshedi, A., & Delirezh, N. (2007). Changes in intestinal microflora and humoral immune response following probiotic administration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6, 1183-1189.

Tuohy, K. M., Probert, H. M., Smejkal, C. W., & Gibson, G. R. (2003). Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, 8(15), 692-700.

U

Urán, P. A., Gonçalves, A. A., Taverne-Thiele, J. J., Schrama, J. W., Verreth, J. A. J., & Rombout, J. H. W. M. (2008). Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 751-760.

V

Vandenberghe, J., Li, Y., Verdonck, L., Li, J., Sorgeloos, P., Xu, H. S., y Swings, J. (1998). Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture*, 169, 121-132.

Van den Bogaard, A. E., & Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14 (4), 327-335.

Von Holst, C., Robouch, P., Bellorini, S., & Ezerskis, Z. (2016). A review of the work of the EU Reference Laboratory supporting the authorisation process of feed additives in the EU.[corrected]. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 33(1), 66-77.

Van Muiswinkel, W. B. (2008). A history of fish immunology and vaccination I. The early days. *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 397-408.

Varela, J. L., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Arijo, S., León-Rubio, J. M., García-Millán, I., ... & Mancera, J. M. (2010). Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream *Sparus auratus*. *Aquaculture*, 309 (1), 265-271.

Vázquez-Torres, A., & Bäumlner, A. J. (2016). Nitrate, nitrite and nitric oxide reductases: from the last universal common ancestor to modern bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 29, 1-8.

Velmurugan, S., Jerin, N., Babu, M. M., Bindhu, F., Dhas, S. A., & Citarasu, T. (2015). Screening and characterization of antiviral compounds from *Enteromorpha flexuosa* against white spot syndrome virus (WSSV) and its in vivo influence on Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture International*, 23 (1), 65-80.

Vendrell, D., Balcazar, J. L., Blas de, I., Ruiz-Zarzuola, I., Gironés, O., & Muzquiz, J. L. (2008). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31, 337-345.

Vendrell, D., Balcazar, J. L., Ruiz-Zarzuola, I., Blas de, I., & Muzquiz, J. L. (2004). Principios generales sobre la vacunación en peces. *Biotecnología*, 9, 14-23.

Venkat, H. K., Sahu, N. P., & Jain, K. K. (2004). Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*, 35, 501-507.

- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 655-671.
- Vidal, S., Tapia-Paniagua, S. T., Moriñigo, J. M., Lobo, C., de la Banda, I. G., del Carmen Balebona, M., & Moriñigo, M. Á. (2016). Effects on intestinal microbiota and immune genes of *Solea senegalensis* after suspension of the administration of *Shewanella putrefaciens* Pdp11. *Fish & Shellfish Immunology*, 58, 274-283.
- Vine, N. G., Leukes, W. D., & Kaiser, H. (2004). In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, 231, 145-152.
- Vine, N. G., Leukes, W. D., & Kaiser, H. (2006). Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 404-427.
- Vipond, R., Bricknell, I. R., Durant, E., Bowden, T. J., Ellis, A. E., Smith, M., & MacIntyre, S. (1998). Defined deletion mutants demonstrate that the major secreted toxins are not essential for the virulence of *Aeromonas salmonicida*. *Infection and Immunity*, 66, 1990-1998.

W

- Wakabayashi, H., Toyota, H., & Egusa, S. (1977). Artificial infection of yellowtail with a gastral administration of cultured *Pasteurella piscicida* cells. *Fish Pathology*, 11, 207-211.
- Wang, H., Liu, P., Hu, T., & Chen, X. (1993). Study on the intestinal microflora of carp in freshwater culture ponds. *Acta hydrobiologica Sinica/Chung-kuo ko hsueh yuan shui sheng sheng wu yen chiu so*, 18(4), 354-359.
- Wang, Y. (2002). The function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292, 396-401.
- Wang, X., & Zhan, W. (2006). Development of an immunochromatographic test to detect white spot syndrome virus of shrimp. *Aquaculture*, 255, 196-200.
- Wang, X., Ribeiro, A. A., Guan, Z., Abraham, S. N., & Raetz, C. R. (2007). Attenuated virulence of a *Francisella* mutant lacking the lipid A 4'-phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(10), 4136-4141
- Wang, Y. B. (2007). Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269, 259-264.
- Wang, Y., & Xu, Z. (2007). Safety evaluation of probiotic PSB0201 (*Rhodopseudomonas palustris*) using primary culture epithelial cells isolated from tilapia (*Oreochromis nilotica*) intestine. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 15, 233-236.
- Wang, Y. B., Li, J.-R., & Lin, J. (2008). Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture*, 281, 1-4.
- Wang, Z., & Zhang, S. (2010). The role of lysozyme and complement in the antibacterial activity of zebrafish (*Danio rerio*) egg cytosol. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(5), 773-777
- Wang, J. T., Chang, S. C., Wang, H. Y., Chen, P. C., Shiau, Y. R., & Lauderdale, T. L. (2013). High rates of multidrug resistance in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated from inpatients and outpatients in Taiwan. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 75 (4), 406-411.
- Wang, L., Guo, H., Zhang, N., Ma, Z., Jiang, S., & Zhang, D. (2015). Molecular characterization and functional analysis of a peroxiredoxin 1 cDNA from golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Developmental & Comparative Immunology*, 51 (2), 261-270.

- Wang, L., Shao, C., Xu, W., Zhou, Q., Wang, N., & Chen, S. (2017). Proteome profiling reveals immune responses in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with *Edwardsiella tarda* by iTRAQ analysis. *Fish & Shellfish Immunology*, 66, 325-333.
- Wong, H. C., Chen, M. C., Liu, S. H., & Liu, D. P. (1999). Incidence of highly genetically diversified *Vibrio parahaemolyticus* in seafood imported from Asian countries. *International Journal of Food Microbiology*, 52 (3), 181-188.
- Wong, H. C., & Wang, P. (2004). Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology*, 96 (2), 359-366.
- Wu, S., Wang, G., Angert, E. R., Wang, W., Li, W., & Zou, H. (2012). Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine. *PloS one*, 7 (2), e30440.
- Wu, Y., Wang, Y., Zou, H., Wang, B., Sun, Q., Fu, A., ... & Li, W. (2017). Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* SC06 induces autophagy to protect against pathogens in macrophages. *Frontiers in Microbiology*, 8.

X

- Xin, X. D., He, J. G., Qiu, W., Tang, J., & Liu, T. T. (2015). Microbial community related to lysozyme digestion process for boosting waste activated sludge biodegradability. *Bioresource Technology*, 175, 112-119
- Xing, C. F., Hu, H. H., Huang, J. B., Fang, H. C., Kai, Y. H., Wu, Y. C., ... & Chi, S. C. (2013). Diet supplementation of *Pediococcus pentosaceus* in cobia (*Rachycentron canadum*) enhances growth rate, respiratory burst and resistance against photobacteriosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 35, 1122-1128.
- Xu, C., Wang, S., Zhaoxia, Z., & Peng, X. (2005). Immunogenic cross-reaction among outer membrane proteins of Gram-negative bacteria. *International Immunopharmacology*, 5, 1151-1163.
- Xu, Z., Chen, C. F., Mao, Z. J., & Zhu, W. Y. (2009). Detection of serum and mucosal antibody production and antibody secreting cells (ASCs) in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) following vaccination with *Vibrio harveyi* via different routes. *Aquaculture*, 287(3), 243-247.
- Xu, G., Sheng, X., Xing, J., & Zhan, W. (2011). Effect of temperature on immune response of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) to inactivated lymphocystis disease virus (LCDV). *Fish & Shellfish Immunology*, 30 (2), 525-531.
- Xu, G., Zhan, W., Ding, B., & Sheng, X. (2013). Molecular cloning and expression analysis of polymeric immunoglobulin receptor in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 35(3), 653-660.

Y

- Yadav, S., Verma, D. K., Pradhan, P. K., Dobriyal, A. K., & Sood, N. (2014). Phenotypic and genotypic identification of *Aeromonas* species from aquatic environment. *International Journal of Aquatic Science*, 5(1), 13-20.

- Yang, H. L., Sun, Y. Z., Ma, R. L., & Ye, J. D. (2012). PCR-DGGE analysis of the autochthonous gut microbiota of grouper *Epinephelus coioides* following probiotic *Bacillus clausii* administration. *Aquaculture Research*, 43(4), 489-497.
- Yang, H., Ni, H. M., Guo, F., Ding, Y., Shi, Y. H., Lahiri, P., ... & Zatloukal, K. (2016). Sequestosome 1/p62 protein is associated with autophagic removal of excess hepatic endoplasmic reticulum in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 291(36), 18663-18674.
- Yasunaga, N., Hatai, K., & Tsukahara, J. (1983). *Pasteurella piscicida* from an epizootic of cultured red sea bream *Fish Pathology*, 18, 107-110
- Yeung C.W., Woo M., Lee K., & Greer C.W. (2011). Characterization of the bacterial community structure of Sydney Tar Ponds sediment. *Canadian Journal of Microbiology*, 57, 493-503.
- Young-Hyo C., Jong-Keun K., Hong-Jong K., Won-Yong K., Young-Bae K., & Yong-Ha P. (2001). Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent in-vivo studies. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 80, 193-199.
- Yu, H. B., Kielczewska, A., Rozek, A., Takenaka, S., Li, Y., Thorson, L., & Finlay, B. B. (2009). Sequestosome-1/p62 is the key intracellular target of innate defense regulator peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 36007-36011.
- Yúfera, M., & Darias, M. J. (2007). Changes in the gastrointestinal pH from larvae to adult in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 267, 94-99.

Z

- Zai, A. S., Ahmad, S., & Rasool, S. A. (2009). Bacteriocin production by indigenous marine catfish associated *Vibrio* spp. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22, 162-167.
- Zarkasi, K. Z., Abell, G. C., Taylor, R. S., Neuman, C., Hatje, E., Tamplin, M. L., ... & Bowman, J. P. (2014). Pyrosequencing-based characterization of gastrointestinal bacteria of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) within a commercial mariculture system. *Journal of Applied Microbiology*, 117(1), 18-27.
- Zeng, L. B., Zhuang, X. R., Huang, L. L., Zhang, Y. Y., Chen, C. Y., Dong, K., ... & Guo, X. K. (2015). Comparative subproteome analysis of three representative *Leptospira interrogans* vaccine strains reveals cross-reactive antigens and novel virulence determinants. *Journal of Proteomics*, 112, 27-37.
- Zhang, X. H., & Austin, B. (2000). Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 23, 93-102.
- Zhang, X. H., Meaden, P. G., & Austin, B. (2001). Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (7), 3161-3167.
- Zhang, C., Yu, L., & Qian, R. (2008). Cloning and expression of *Vibrio harveyi* OmpK* and GAPDH* genes and their potential application as vaccines in large yellow croakers *Pseudosciaena crocea*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 20(1), 1-11.
- Zhang, Y. A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., & Sunyer, J. O. (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology*, 11, 827-835.
- Zhang, B. C., Zhang, J., Xiao, Z. Z., & Sun, L. (2014). Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) viperin is a virus-responsive protein that modulates innate immunity and promotes resistance against megalocytivirus infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 45(1), 35-42.

- Zhang, L., Wang, Y., Liang, J., Song, Q., & Zhang, X. H. (2016). Degradation properties of various macromolecules of cultivable psychrophilic bacteria from the deep-sea water of the South Pacific Gyre. *Extremophiles*, 20(5), 663-671.
- Zhang, M., Sun, Y., Liu, Y., Qiao, F., Chen, L., Liu, W. T., ... & Li, E. (2016). Response of gut microbiota to salinity change in two euryhaline aquatic animals with reverse salinity preference. *Aquaculture*, 454, 72-80
- Zhao, D. H., Sun, J. J., Liu, L., Zhao, H. H., Wang, H. F., Liang, L. Q., ... & Li, G. F. (2009). Characterization of two phenotypes of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from diseased juvenile *Trachinotus ovatus* reared in cage mariculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40, 281-289.
- Zheng, Y. T., Shahnazari, S., Brech, A., Lamark, T., Johansen, T., & Brumell, J. H. (2009). The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *The Journal of Immunology*, 183(9), 5909-5916.
- Zherdmant, M. T., San Miguel, L., Serrano, J., Donoso, E., & Mialhe, E. (1997). Estudio y utilización de probióticos en el Ecuador. *Panorama Acuicola*, 2, 28.
- Zhou R., Cusumano C., Sui D., Garavito R. M., & Kroos L. (2009) Intramembrane proteolytic cleavage of a membrane-tethered transcription factor by a metalloprotease depends on ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106, 16174–16179.
- Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y., & Li, W. (2010). Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36, 501-509.
- Zhou, X., & Wang, Y. (2012). Probiotics in aquaculture-benefits to the health, technological applications and safety. En *Health and Environment in Aquaculture*. InTech.
- Zhou, C., Lin, H., Huang, Z., Wang, J., Wang, Y., & Yu, W. (2016). Cloning and expression analysis of c-type lysozyme gene in golden pompano, *Trachinotus ovatus*. *Fish & shellfish Immunology*, 54, 580-585.
- Zhu, C., Sun, B., Liu, T., Zheng, H., Gu, W., He, W., ... & Peng, X. (2017). Genomic and transcriptomic analyses reveal distinct biological functions for cold shock proteins (Vpa CspA and Vpa CspD) in *Vibrio parahaemolyticus* CHN25 during low-temperature survival. *BMC genomics*, 18 (1), 436.
- Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M. H., Takami, G. A., Lovett, D. L., Mirvaghefi, A. R., & Shakouri, M. (2006). The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252 (2), 516-524.
- Zijun, Ch., Peng, B., Sanying, W., & Peng, X. (2004). Rapid screening of highly efficient vaccine candidates by immunoproteomics. *Proteomic*, 4, 3203–3213
- Zokaeifar, H., Babaei, N., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K., & Balcazar, J. L. (2014). Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 36 (1), 68-74.
- Zou, L., Wang, J., Huang, B., Xie, M., & Li, A. (2011). MtsB, a hydrophobic membrane protein of *Streptococcus iniae*, is an effective subunit vaccine candidate. *Vaccine*, 29(3), 391-394.
- Zorrilla, I., Balebona, M. C., Sarasquete, C., & Borrego, J. J. (1999). Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, 22, 167-172.
- Zorrilla, I., Arijo, S., Chabrillon, M., Diaz, P., Martinez-Manzanares, E., Balebona, M. C., ... & Morinigo, M. A. (2003). *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *Journal of Fish Diseases*, 26, 103-108.

Bibliografía

ANEXOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TSA salino (agar soja tripticasa)

Agar TSA	40 g
Agua destilada (Volumen final)	1000 mL
Complemento 2 % Cloruro sódico	

Esterilizar a 121° C, 15 min.

TSB salino (caldo soja tripticasa)

Caldo TSB	30 g
Agua destilada (Volumen final)	1000 mL
Complemento de 2 % Cloruro sódico	

Esterilizar a 121° C, 15 min.

Medio Agar Yema de Huevo (pH 7,3- 7,4)

Triptona	5 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	1 g
Agar	15 g
Solución de yema de huevo 5%	100 mL
Agua destilada (Volumen final)	1000 mL
Complemento de 2 % en Cloruro sódico	

*Solución de yema de huevo 5 %: Lavar huevos de gallina frescos durante 30 minutos en etanol 70 %. Dejar secar y abrir asépticamente. Bajo condiciones de esterilidad se separan la yema de la albúmina. Se mezclan homogéneamente 5 mL de yema de huevo con 95 mL de PBS.

Medio Agar Leche (Agar Caseína) (pH 7,2)

Leche descremada	50 g
TSA	40 g
Agua destilada (Volumen final)	1000 mL
Complemento de 2 % en Cloruro sódico	

Por un lado, disolver 50 g de leche descremada en polvo en 500 mL de agua destilada. Por otro, preparar una suspensión de 40 g de TSA en 500 mL de agua destilada. Calentar hasta disolver el agar. Esterilizar en recipientes separados la leche y el medio. Dejar enfriar a una temperatura de 60 °C, aproximadamente y verter la leche sobre el agar. Mezclar bien y repartir en placas.

Medio Agar almidón (pH 7,2)

TSA	40 g
Almidón	4 g
Agua destilada (Volumen final)	1000 mL
Complemento de 2 % Cloruro sódico	

Esterilizar a 121° C, 15 min.

Medio Gelatina (Frazier) (pH 7,2)

Peptona	10 g
Cloruro sódico	5 g
Extracto de carne	5 g
Gelatina	4,8 g
Agar	15 g
Agua destilada (Volumen final)	1000 mL
Complemento con 2 % en Cloruro sódico	

Esterilizar a 121° C, 15 min.

Tampón fosfato salino (PBS) (pH 7,2)

Cloruro sódico	8,8 g/L
Fosfato potásico	0,28 g/L
Fosfato disódico	0,7 g/L
Agua químicamente pura (Volumen final)	1 L

Tampón TAE (pH 7,4)

Tris base	20 mM
Acetato sódico	10 mM
EDTA	0,5 mM

Tampón TBE 0,5X (pH 8,0)

Tris base	45 mM
Ácido bórico	45 mM
EDTA	1 mM

Soluciones para electroforesis**Tampón de Carrera Tris/Glicina/SDS**

Tris Base	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,1 %

Guardar a 4°C.

Tampón de muestra 2X Laemmli

SDS	4 %
Glicerol	20 %
2-Mercaptoetanol	10 %
Azul de bromofenol	0,004 %
Tris HCl pH 6.8	0,125 M

Gel concentrador 4%

Agua químicamente pura	3,65 mL
40% Acrilamida	0,625 mL
1M Tris-HCl pH 6,8	0,625 mL
10% SDS	0,05 mL
10% APS	0,05 mL
TEMED	0,005 mL

Gel separador 10%

Agua químicamente pura	29,6 mL
40% Acrilamida	18,75 mL
1,5 M Tris-HCl pH8,8	18,75 mL
10% SDS	0,75 mL
10% APS	0,75 mL
TEMED	30 uL

Solución Stock de Hidratación

Urea	7 M
Tiorea	2 M
Chaps	4 %
DTT	50 mM
Anfolitos	0,2 %
Azul de Bromofenol	0,002 %
Cocktail inhibidor de proteasas	1 %

Tampón de equilibrio I

Urea	6 M
SDS	2 %
Tris-HCL, pH 8,8	0,375 M
Glicerol	20 %
DTT	130 mM
Azul de Bromofenol	0,002 %

Tampón de equilibrio II

Urea	6 M
SDS	2 %
Tris-HCL, pH 8,8	0,375 M
Glicerol	20 %
Iodoacetamida	130 mM
Azul de Bromofenol	0,002 %

Agarosa

Tris Glicina SDS	100 mL
Agarosa	0,5 %
Azul de Bromofenol	0,002 %

Soluciones para ELISA**Solución de lavado (PBS-T)**

Tampón Fosfato Salino (PBS)

Tween 20 0,25 %

Conservación a 4°C de temperatura

Solución bloqueante

Tampón Fosfato Salino (PBS)

Tween 20 0,25 %

Leche desnatada en polvo 3 %

Conservación a 4°C de temperatura

Solución PBS-T-BSA

Tampón Fosfato Salino (PBS)

Tween 20 0,25 %

Albúmina sérica bovina (BSA) 3 %

Conservación a 4°C de temperatura

Soluciones para *Western blot*

Solución Equilibrado *Western Blot*

Tris HCL 48 mM

Glicina 39 mM

SDS 0,037 %

Metanol 20 %

Conservación a 4°C de temperatura

Solución de lavado (PBS-T)

Tampón Fosfato Salino (PBS)

Tween 20 0,5 %

Conservación a 4°C de temperatura

Solución bloqueante

Tampón Fosfato Salino (PBS)

Tween 20 0,5 %

Leche desnatada en polvo 3 %

Conserva a 4°C en menos de 48 h

Solución PBS-T-L

Tampón Fosfato Salino (PBS)

Tween 20 0,25 %

Leche desnatada en polvo 3 %

Conservación a 4°C de temperatura

Soluciones para la extracción de DNA

Tampón de resuspensión

1 M Tris-HCl pH 8 10 mL

0,5 M EDTA pH 8 20 mL

Agua químicamente pura (Volumen final) 100 mL

Tampón de lisis

1 M Tris-HCl pH 8 10 mL

0,5 M EDTA pH 8 20 mL

10% SDS 10 mL

Agua químicamente pura (Volumen final) 100 mL

Soluciones para DGGE

Tampón TAE 50x

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 mL
Agua químicamente pura (Volumen final)	1 L

Solución desnaturalizante 100%

Urea	105,4 g
40% acrilamida:bisacrilamida (37.5 : 1)	50 mL
Formamida	100 mL
50xTAE buffer	2,5 mL
Glicerol	5 mL
Agua químicamente pura (Volumen final)	250 mL

Solución desnaturalizante 0%

Urea	105,4 g
40% acrilamida:bisacrilamida (37.5 : 1)	50 mL
50xTAE buffer	2,5 mL
Glicerol	5 mL
Agua químicamente pura (Volumen final)	250 mL

Protocolo de tinción de plata (Proteínas)

- 1- Fijación del gel en 50 % de metanol y 5 % de ácido acético durante 20 min
- 2- Lavado gel en 50 % de metanol durante 10 min
- 3- Lavado gel en agua toda la noche
- 4- Sensibilización del gel en 0.02 % de tiosulfato de sodio durante 1 min
- 5- Lavado del gel en agua durante 1 min
- 6- Lavado del gel en agua durante 1 min
- 7- Incubación del gel en 0.1 % de nitrato de plata durante 20 min a 4 °C
- 8- Lavado del gel en agua durante 1 min
- 9- Cambio de la bandeja de tinción
- 10- Lavado del gel en agua durante 1 min
- 11- Revelado del gel en 0,04 % de formalina y 2 % de carbonato de sodio
- 12- Finalización del revelado con una solución al 5 % de ácido acético
- 13- Dejar el gel a 4 °C en una solución al 1 % de ácido acético

Protocolo de tinción de plata (DGGE)

- 1- Fijación del gel en 10 % de etanol y 0,5 % de ácido acético durante 5 min en frío
- 2- Sensibilización del gel en 0,15 % de nitrato de plata y 0,15 % formaldehído durante 6-7 min a temperatura ambiente
- 3- Lavado del gel en agua durante 10-15 s
- 4- Revelado del gel en 1,5 % de hidróxido de sodio y 0,2% de formaldehído, durante 3-5 min a temperatura ambiente
- 5- Fase de parada en 10 % Etanol y 0,5 % de acético durante 2 min.

Protocolo de tinción con el método AEC (3-amino-9-etilcarbazol)

1- Añadir 5 gotas de 1 % AEC (diluido en N, N dimetilformamida) a 5 mL de tampón acetato 0.05 M pH 5,5 y mezclar bien.

2- Añadir 5 gotas de peróxido de hidrógeno 0,3 % a la solución anterior y mezclar bien.

3- Incubar durante 10-15 min

4- Detener reacción con agua destilada

Solución de tinción Coomasie

Azul Coomasie G-250	0,02 %
Sulfato de aluminio 18 hidratado	5 %
Etanol (96%)	10 %
Ácido fosfórico (85 %)	2 %

Solución de desteñido

Etanol (96 %)	10 %
Ácido fosfórico (85 %)	2 %

Cepas utilizadas en los ensayos de *Dot blot*, especies bacterianas y origen del aislamiento.

Cepas	Especie bacteriana	Origen de aislamiento
6	<i>Vibrio harveyi</i>	
227	<i>V. harveyi</i>	
11ACE		Acedía (<i>Dicologlossa cuneata</i>)
12ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
13ACE		Acedía (<i>D.a cuneata</i>)
14A23_5_11		Piel de dorada (<i>Sparus aurata</i>)
14ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
14B23_5_11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
16.99	<i>V. harveyi</i>	
16ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
17ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
18ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
19ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
1A12-4-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
1ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
1B27_6_11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
1C12_4_11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
20ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
21ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
22ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
23ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
24ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
25ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
26ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
27ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
28ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
29ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
2A23-5-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
2A28_6_11		Piel de dorada (<i>S.aurata</i>)
2ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
2B5-10-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
2E12_4_11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
30ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
32ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
33ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
34ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
36ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
37ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
38ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
39ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
3A5-10-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
3B5_10_11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
3c 05/10/2011		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
3C12_4_11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
3C23_5_11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
3E12_4_11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)

Cepas utilizadas en los ensayos de <i>Dot blot</i> (cont. 2)		
Cepas	Especie bacteriana	Origen de aislamiento
41ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
42ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
43ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
44ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
45ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
46ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
47ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
48.01	<i>V.harveyi</i>	
48ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
49ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
4ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
4B27-6-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
50ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
51ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
52ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
53ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
54ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
55ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
56ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
57ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
5A12_4_11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
5A5-10-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
5ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
5B5-10-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
5C1_4_11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
5C12-4-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
5C26-5-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
60ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
61ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
62ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
63ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
6A_27_6_11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
6A12-4-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
6A26-5-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
6ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
6B23-5-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
6B27_6_11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
6C26-5-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
6D25-6-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
6D26-5-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
70M3	<i>V. harveyi</i>	
7A27_6_11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
7ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
8A12_4_11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
8A12-4-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)

Cepas utilizadas en los ensayos de <i>Dot blot</i> (cont. 3)		
Cepas	Especie bacteriana	Origen de aislamiento
8A28_6_11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
8B12-4-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
8B28_6_11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
8C26-5-11		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
9A27_6_11		Piel de dorada (<i>Sparus aurata</i>)
9ACE		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
9B23_5_11		Piel de dorada (<i>Sparus aurata</i>)
9H26_5_11		Piel de dorada (<i>Sparus aurata</i>)
A035	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)
A347	<i>Aeromonas salmonicida</i>	
A351	<i>Aeromonas sobria</i>	
ATTCC29690	<i>Photobacterium</i>	
AZ222	<i>V. harveyi</i>	
AZ225.2	<i>V. harveyi</i>	
BA130	<i>V. alginolyticus</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	
CANB	<i>V. alginolyticus</i>	Dorada (<i>S. aurata</i>)
CECT4344	<i>Vibrio anguillarum</i>	
CECT522	<i>V. anguillarum</i>	
CECT525	<i>V. harveyi</i>	
D1.99	<i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>piscicida</i>	
D11.00		Dorada (<i>S. aurata</i>)
D16.99	<i>V. harveyi</i>	Dorada (<i>S. aurata</i>)
D27.98		Dorada (<i>S. aurata</i>)
D29.03		Dorada (<i>S. aurata</i>)
D29.98		Dorada (<i>S. aurata</i>)
D30.98	<i>Vibrio sp.</i>	
D31.98		Dorada (<i>S. aurata</i>)
D35.01		Dorada (<i>S. aurata</i>)
D35.98	<i>V. anguillarum</i>	
D84.98		Dorada (<i>S. aurata</i>)
DB17.99		Dorada (<i>S. aurata</i>)
DBASC2.98	<i>Flavobacterium</i>	
DBASC3.98	<i>Bac+</i>	
DBASC4.98	<i>V. anguillarum</i>	
DBASE2.98		Dorada (<i>S. aurata</i>)
DBH8.97		Hígado de dorada (<i>S. aurata</i>)
DC10.R3	<i>Vibrio sp</i>	Dorada (<i>S. aurata</i>)
DC12R9	<i>V. anguillarum</i>	Dorada (<i>S. aurata</i>)
DC26F3		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DC26F6		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DC26F7		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DC26T2		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DC26T5		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DC26T6		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DC26T7		Acedía (<i>D. cuneata</i>)

Cepas utilizadas en los ensayos de <i>Dot blot</i> (cont. 4)		
Cepas	Especie bacteriana	Origen de aislamiento
DC26T8		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DC26T9		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DC7R1	<i>Vibrio sp.</i>	Dorada (<i>S. aurata</i>)
DC7R9	<i>Vibrio sp.</i>	Dorada (<i>S. aurata</i>)
DCF12.1		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF12.10		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF12.2		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF12.3		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF12.4		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF12.5	<i>Vibrio sp.</i>	Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF12.6		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF12.7		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF12.9		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF16.1		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF16.10		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF16.2		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF16.3		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF16.4		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF16.5		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF16.6		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF16.7		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF16.8		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF16.9		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF18.1		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF18.10		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF18.11	<i>Vibrio sp (parah.natri.algyn)</i>	Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF18.2		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF18.3		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF18.4		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF18.5		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF18.6		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF18.7	<i>Vibrio sp (parah.natri.algyn)</i>	Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF18.8	<i>Vibrio sp (parah.natri.algyn)</i>	Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF18.9	<i>Chromobacterium</i>	Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF21.10		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF21.7		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF21.8		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF21.9		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF26F2		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF6.1		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF6.10		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF6.2		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF6.3		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF6.4		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF6.5		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF6.6		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF6.7		Acedía (<i>D. cuneata</i>)

Cepas utilizadas en los ensayos de <i>Dot blot</i> (cont. 5)		
Cepas	Especie bacteriana	Origen de aislamiento
DCF6.8		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCF6.9		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT12.1		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT12.10		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT12.11		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT12.2		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT12.2		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT12.3		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT12.4		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT12.5		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT12.5		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT12.6		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT12.7		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT12.8		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT12.9		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT16.1		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT16.10		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT16.11		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT16.2		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT16.3		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT16.4		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT16.5		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT16.6		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT16.7		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT16.8		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT16.9		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT18.1		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT18.10	<i>Vibrio sp (parah.natri.algyn)</i>	Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT18.2		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT18.3		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT18.4		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT18.6		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT18.7		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT18.8		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT18.9	<i>Vibrio sp (parah.natri.algyn)</i>	Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT21.1		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT21.10		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT21.2		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT21.3		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT21.4		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT21.5		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT21.6		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT21.7		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT21.8		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT21.9		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT6.1		Acedía (<i>D. cuneata</i>)

Cepas utilizadas en los ensayos de <i>Dot blot</i> (cont. 6)		
Cepas	Especie bacteriana	Origen de aislamiento
DCT6.10		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT6.2		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT6.4		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT6.5		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT6.6		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT6.7		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DCT6.9		Acedía (<i>D. cuneata</i>)
DH10.97	<i>V.alginolyticus</i>	Hígado de dorada (<i>S. aurata</i>)
DH10.99		Hígado de dorada (<i>S. aurata</i>)
DH19.99		Hígado de dorada (<i>S. aurata</i>)
DH26.98	<i>Photobacterium damsela</i>	Hígado de dorada (<i>S. aurata</i>)
DH33.01		Hígado de dorada (<i>S. aurata</i>)
DH34.01		Hígado de dorada (<i>S. aurata</i>)
DH35.01		Hígado de dorada (<i>S. aurata</i>)
DH36.01	<i>Flexibacter</i>	Hígado de dorada (<i>S. aurata</i>)
DH37.01		Hígado de dorada (<i>S. aurata</i>)
DH5.01		Hígado de dorada (<i>S. aurata</i>)
DH5.99		Hígado de dorada (<i>S. aurata</i>)
DH55.02		Hígado de dorada (<i>S. aurata</i>)
DH8.98		Hígado de dorada (<i>S. aurata</i>)
DHB8.98	<i>V. alginolyticus</i>	Hígado de dorada (<i>S. aurata</i>)
DI21		Dorada (<i>S. aurata</i>)
DI21S		Dorada (<i>S. aurata</i>)
DI2A		Dorada (<i>S. aurata</i>)
DP1HE2	<i>V. harveyi</i>	Dorada (<i>S. aurata</i>)
DP1HE21915		Dorada (<i>S. aurata</i>)
DP1HE3		Dorada (<i>S. aurata</i>)
DP1HE4A	<i>V. alginolyticus</i>	Dorada (<i>S. aurata</i>)
DP2H6	<i>V. harveyi</i>	Dorada (<i>S. aurata</i>)
DR		Dorada (<i>S. aurata</i>)
DR5.2	<i>V. harveyi</i>	Dorada (<i>S. aurata</i>)
DR6.01		Dorada (<i>S. aurata</i>)
DU2.01		Dorada (<i>S. aurata</i>)
DU3.01		Dorada (<i>S. aurata</i>)
DU4.01		Dorada (<i>S. aurata</i>)
<i>E.coli 13705</i>	<i>E.coli 13705</i>	
ENTF-OU	<i>Enterococcus faecium</i>	
ERITROBACTER	<i>Eritrobacter sp</i>	
<i>Flexibacter sp.</i>	<i>Flexibacter sp.</i>	
L.ANGILLARUM	<i>V. anguillarum</i>	
L.JOHNSONI	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	
LBRQ30.10		Riñón/Bazo de lenguado (<i>Solea senegalensis</i>)
LG12.00	<i>V. harveyi</i>	Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LG16.00	<i>V. harveyi</i>	Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LG17.00	<i>V. anguillarum</i>	Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LG173.02		Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)

Cepas utilizadas en los ensayos de <i>Dot blot</i> (cont. 7)		
Cepas	Especie bacteriana	Origen de aislamiento
LG1C65.02		Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LG22.03		Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LG38.01		Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LG38.98	<i>Streptococcus. sp</i>	Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LG39.98	<i>V. anguillarum</i>	Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LG4.03		Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LG40.98		Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LG41.01	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LG41.98		Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LG6.00		Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LG65.02	<i>Vibrio sp.</i>	Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LG66.02		Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LG74.02		Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LG75.02		Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LG77.02		Lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGB1.05		Bazo de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGB14.01		Bazo de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGB27.02		Bazo de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGB28.01		Bazo de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGB29.01		Bazo de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGB30.01		Bazo de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGB32.03		Bazo de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGB53.02		Bazo de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGB6.02		Bazo de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGB61.02	<i>V.harveyi</i>	Bazo de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGB7.05		Bazo de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGB78.02	<i>P.damsela</i>	Bazo de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGH V.ALGIN		Hígado de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGH/00		Hígado de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGH21.01		Hígado de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGH21.03		Hígado de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGH24.01		Hígado de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGH28.01		Hígado de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGH37.03		Hígado de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGH40.03		Hígado de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGH46.01		Hígado de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGH6.05		Hígado de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGH60.02	<i>V.harveyi</i>	Hígado de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGH60.02		Hígado de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGH67.02		Hígado de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGH69.02		Hígado de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGLL63.02	<i>V.harveyi</i>	Lenguado (<i>S.senegalensis</i>)
LGR1.03		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR10.03		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)

Cepas utilizadas en los ensayos de <i>Dot blot</i> (cont. 8)		
Cepas	Especie bacteriana	Origen de aislamiento
LGR11.02		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR13.01		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR17.01		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR18.01		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR2.05		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR31.01		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR32.03		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR38.03		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR39.01		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR5.05		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR52.02		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR53.01		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR54.02		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR62.02		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR66.02		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR70.02		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR70.12		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR72		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR76.00		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGR9.01		Riñón de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU12.01		Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU15.01		Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU16.01		Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU19.01		Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU20.01		Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU20.03		Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU23.01		Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU25.01		Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU26		Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU26.01		Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU27.01		Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU32.01		Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU34.03	<i>V. harveyi</i>	Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU4.00		Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU45.01		Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU47.01	<i>V. parahaemolyticus</i>	Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU3.05		Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LGU5.00		Úlcera de lenguado (<i>S. senegalensis</i>)
LH25.98	<i>Vibrio sp</i>	
LL12.98	<i>Vibrio alginolyticus</i>	
LL13.98	<i>Staphylococcus</i>	
LL14.98	<i>Micrococcus</i>	
LL16.98	<i>Bacilo+</i>	
LL9.98	<i>Vibrio sp.</i>	

Cepas utilizadas en los ensayos de <i>Dot blot</i> (cont. 9)		
Cepas	Especie bacteriana	Origen de aislamiento
MICROCOCCUS	<i>Micrococcus sp.</i>	
P12	<i>Pseudoalteromonas</i>	
P15	<i>Pseudoalteromonas</i>	
P44	<i>Chromobacterium</i>	
P53	<i>Pseudoalteromonas</i>	
PDP1		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
PDP10		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
PDP11	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
PDP12		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
PDP13	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
PDP14		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
PDP15		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
PDP16		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
PDP2		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
PDP3		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
PDP4		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
PDP5		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
PDP6		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
PDP7		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
PDP8		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
PDP9		Piel de dorada (<i>S. aurata</i>)
PP1	<i>Photobacterium damsela</i>	
S.TIPHI	<i>Salmonella typhimurium</i>	
TW493.02	<i>V. harveyi</i>	
V.ALGIN.	<i>V. alginolyticus</i>	
V.VULNIF	<i>Vibrio vulnificus</i>	
VA1	<i>V.alginolyticus</i>	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	
<i>Vibrio fisheri</i>	<i>Vibrio fisheri</i>	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	
<i>Vibrio splendidus</i>	<i>Vibrio splendidus</i>	

Cepas utilizadas en los ensayos de *Dot blot* con identidad y origen desconocido

1	2	14	15	20	25
26	30	41	42	43	44
45	46	47	48	49	50
52	53	54	55	56	57
58	59	60	61	62	162
204	222	234	234	1376	4246
35103	137106	?98	02.G.L	10.04	10.64
10PINO	11.04	12.01	12.04	128-2	12PINO
13.01	13.04	13PINO	14.01	14.04	14PINO
15ACE	15PINO	16.01	16.94	16PINO	17PINO
18PINO	19PINO	1PINO	2.04	20PINO	21PINO
22PINO	23PINO	24PINO	25.01	25PINO	26.01
265-1	26PINO	27.98	27PINO	28PINO	29PINO
2PINO	30PINO	31PINO	32PINO	33.01	33PINO
34.03	34PINO	35PINO	36.03	36PINO	37PINO
38PINO	39.03	39PINO	3PINO	4.04	41.03
41PINO	42.03	42PINO	43.03	43PINO	44.03
44PINO	45.03	45PINO	46.03	46PINO	47.03
47PINO	48.04	48PINO	49.03	4983-1X	49PINO
4PINO	5.04	50.03	50PINO	51.03	51PINO
52.03	52.5	52PINO	53.03	53PINO	54.03
54PINO	55.03	55PINO	56PINO	57PINO	58PINO
59PINO	5PINO	6.04	6.8	60PINO	61PINO
62PINO	6PINO	7.01	7.04	73.02	75.02
7PINO	8.04	80M12	8PINO	9PINO	AZ204.2
AZ227	B1	B11	B32	B48	B52
B6	CB1	CB2	CB3	CGCT	CH10.01
CH11.01	DB13.99	DB56.02	DB6.98	DBASC1.98	DBASE3.98
ERM	FLAVOB.1.3.00	FLEXI.P65031	G2P	H1	H6
HB19	INT1	INT2	INT3	INT4	J-1/08
J-2/08	L6.99	LB18.99	LB8.03	LBR10.99	LH14.00
LH22.98	LH23.98	LH24.98	LH27.03	LH28.03	LH29.03
LH8.01	LL1.03	LL10.98	LL11.98	LL15.03	LL2.03
LL2.98	LL25.03	LL26.03	LL3.03	LL3.98	LN5.03
LN7.03	LR4.03	LR6.03	LR9.03	LS1	LU7.01
LV1	LV5(1)	LVH(1)	M93SR	P1	P13
P16	P17	P17	P18	P19	P21
P22	P23	P24	P25	P26	P27
P28	P29	P3	P30	P32	P34
P36	P37	P38	P39	P5	P54
P57	P59	P67	P8	PD51G	PDB
PDB1	PDB2	PDB3	PDB4	PDI1	PDI2
PDI3	PDI4	PDI6	PDI7	PLI1	PLI2
PLI3	PLI4	PLP1	PLP2	PLP3	PLP4
PLP5	PLP6	PLP7	PLP8	PP5	PP7
PP8	PP8H	PS.AER.21.9	PS1	PSW10	PSW2
PSW3	PSW4	PSW5	PSW6	PSW7	PSW8
PSW9	R1M2	R6	RPH543.1	RPH549.1	S1M1
S1M2	S1M3	S1M4	S1M5	S1M6	S2B1
S2B3	S2B4	S2M1	S2M2	S2M3	S2R1
S3M1	S3R1	S3R2	S3R3	SBR2	SBR3
SBR4	SBR5	V1B571	VAC613	VB56.02	VIBRIO L2
VIBRIO V2	VSP1	VSP2	VSP7	WPY13.7.1.00	XC24.10
XCPUC	XM19	XSTS	YM19SW	YMH	

Porcentaje de semejanza de señal entre cada una de las cepas respecto a los controles positivos (en unos casos *V. harveyi* Lg16.00 y en otros *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41.01).

Porcentaje de semejanza = Intensidad media de la cepa muestreada x 100 / Intensidad media del control positivo.

Cepas	Lg16.00	Lg41.01
1A12-4-11	115,49	21,84
1	82,45	35,74
2	8,77	7,20
2,04	23,45	42,17
4,04	28,17	35,29
5,04	15,09	16,94
6	16,83	40,60
6,04	99,09	55,57
6,8	43,47	51,54
7,01	12,09	27,18
7,04	55,77	68,56
8,04	72,69	45,63
10,04	10,37	92,21
10,64	70,19	44,54
11,04	21,49	116,60
12,01	92,91	54,65
12,04	95,92	61,21
13,01	49,51	62,78
13,04	67,19	54,50
14	51,24	50,87
14,01	60,64	53,24
14,04	15,83	23,31
15	14,52	49,27
16,01	109,39	73,64
16,94	18,50	44,11
16,99	12,73	29,68
20	123,32	31,94
25	18,16	2,06
25,01	109,49	60,44
26	30,96	42,49
26,01	51,85	54,09
27,98	0,04	0,29
30	14,35	24,06
33,01	54,31	55,39
34,03	85,78	62,38
36,03	49,07	51,78
39,03	51,46	39,91
41	61,31	24,81
41,03	80,56	45,97

42	115,89	35,50
42,03	1,18	5,88
43	91,08	46,27
43,03	22,75	6,97
44	133,42	16,20
44,03	0,268	0
45	0	32,20
45,03	2,30	1,71
46	6,13	28,47
46,03	370	0,07
47	8,90	3,65
47,03	30,08	12,81
48	48,06	27,45
48,01	81,74	50,09
48,04	114,60	7,33
49	4,10	25,54
49,03	17,96	12,26
50	0	5,51
50,03	17,14	13,81
51,03	29,28	40,62
52	36,01	36,27
52,03	42,39	40,44
52,5	52,95	38,31
53	28,39	27,18
53,03	18,05	17,05
54	54,74	51,13
54,03	33,31	12,85
55	0,00	19,35
55,03	29,82	14,33
56	9,94	28,97
57	28,38	0,01
58	70,96	4,65
59	12,24	27,25
60	1,18	17,39
61	12,25	39,78
62	36,36	52,48
73,02	74,17	4,19
75,02	0,00	0,00
162	138,49	27,51
204	76,62	10,44
222	22,10	56,13
227	42,15	44,63
234	126,71	67,14
234	42,05	29,04
1376	19,57	0,06

4246	18,00	34,76
35103	53,64	0,02
137106	1,00	7,63
?,98	58,08	45,35
02,G,L	18,99	11,16
10PINO	75,71	9,08
11ACE	58,11	17,45
128-2	57,59	39,89
12ACE	54,54	0,09
12PINO	51,25	7,29
13ACE	53,10	14,15
13PINO	57,86	5,62
14A23_5_11	7,02	18,96
14ACE	31,04	12,58
14B23_5_11	33,41	21,55
14PINO	50,09	32,18
15ACE	0,00	1,16
15PINO	66,83	18,72
16ACE	62,46	35,23
16PINO	21,41	33,96
17ACE	64,54	42,31
17PINO	24,57	26,44
18ACE	51,68	33,22
18PINO	34,84	8,65
19ACE	35,67	0,01
19PINO	51,15	31,11
1ACE	29,02	21,01
1B27_6_11	52,39	15,33
1C12_4_11	96,30	18,73
1PINO	87,71	29,70
20ACE	63,17	2,50
20PINO	31,82	27,23
21ACE	34,95	3,24
21PINO	17,25	14,07
22ACE	23,73	10,20
22PINO	16,16	20,75
23ACE	17,83	3,34
23PINO	5,56	5,90
24ACE	21,85	4,46
24PINO	9,49	7,86
25ACE	17,29	0,51
25PINO	16,50	11,53
265-1	25,22	1,25
26ACE	13,49	0,00
26PINO	21,70	13,67

27ACE	80,25	200,15
27PINO	48,72	34,77
28ACE	51,59	44,66
28PINO	48,69	46,46
29ACE	23,40	5,55
29PINO	57,22	8,93
2A23-5-11	0,00	22,05
2A28_6_11	79,49	12,55
2ACE	0,00	0,00
2B5-10-11	17,29	15,22
2E12_4_11	83,42	21,25
2PINO	7,37	0,37
3 c05/10/2011	76,54	6,65
3 pino	0,00	0,00
30ACE	11,49	0,26
30PINO	11,68	8,43
31PINO	33,07	28,79
32ACE	48,30	21,54
32PINO	43,90	28,12
33ACE	23,70	22,51
33PINO	12,94	29,62
34ACE	5,96	23,19
34PINO	12,61	31,68
35PINO	49,22	32,70
36ACE	24,67	36,11
36PINO	49,77	66,07
37ACE	29,36	17,19
37PINO	40,20	65,93
38ACE	27,06	27,34
38PINO	40,32	50,18
39ACE	23,30	23,00
39PINO	36,82	53,82
3A5-10-11	25,82	3,03
3B5_10_11	36,45	0,05
3C12_4_11	69,77	0,72
3C23_5_11	91,71	17,00
3E12_4_11	27,87	7,96
41ACE	37,46	22,08
41PINO	40,82	34,50
42ACE	41,98	30,11
42PINO	44,24	45,20
43ACE	47,24	43,57
43PINO	43,54	63,48
44ACE	55,91	31,84
44PINO	60,86	73,31

45ACE	31,33	27,52
45PINO	41,67	57,78
46ACE	36,70	31,08
46PINO	44,09	29,87
47ACE	34,51	32,52
47PINO	35,67	37,60
48ACE	26,40	10,51
48PINO	35,51	40,56
4983-1X	67,25	0,77
49ACE	16,90	36,30
49PINO	37,89	43,74
4ACE	5,20	8,74
4B27-6-11	101,17	20,76
4PINO	57,42	39,77
50ACE	28,23	21,70
50PINO	60,40	20,09
51ACE	49,52	44,83
51PINO	52,23	26,47
52ACE	43,73	29,31
52PINO	43,89	32,04
53ACE	33,68	5,55
53PINO	45,15	4,89
54ACE	45,40	37,38
54PINO	44,18	69,70
55ACE	11,16	8,44
55PINO	66,27	27,60
56ACE	34,10	140,39
56PINO	92,30	18,14
57ACE	19,06	18,26
57PINO	82,59	20,03
58PINO	146,49	36,33
59PINO	63,03	46,76
5A12_4_11	73,45	4,12
5A5-10-11	3,04	1,43
5ACE	37,10	0,03
5B5-10-11	13,52	37,11
5C1_4_11	120,76	1,42
5C12-4-11	0,00	35,34
5C26-5-11	155,35	24,98
5PINO	44,67	21,65
60ACE	35,24	35,14
60PINO	42,76	8,87
61ACE	29,02	18,48
61PINO	55,88	6,50
62ACE	20,55	17,05

62PINO	45,42	27,73
63ACE	13,18	12,40
6A_27_6_11	40,39	13,77
6A12-4-11	322,56	15,87
6A26-5-11	99,50	5,45
6ACE	48,66	1,29
6B23-5-11	0,00	34,04
6B27_6_11	114,41	1,50
6C26-5-11	0,00	28,65
6D25-6-11	0,00	2,45
6D26-5-11	0,00	25,08
6PINO	35,55	1,16
70M3	60,68	40,11
7A27_6_11	174,24	8,83
7ACE	31,79	0,21
7PINO	61,85	29,79
80M12	52,09	38,80
8A12_4_11	58,32	58,98
8A12-4-11	0,00	4,38
8A28_6_11	111,81	36,96
8B12-4-11	0,00	11,93
8B28_6_11	61,65	22,28
8C26-5-11	0,00	7,70
8PINO	95,71	42,72
9A27_6_11	112,81	1,79
9ACE	130,74	42,35
9B23_5_11	35,29	2,89
9H26_5_11	47,66	22,60
9PINO	39,72	2,26
A035	17,32	40,96
A347	42,49	26,39
A351	4,51	22,92
ATTCC29690	22,74	66,98
AZ204,2	41,25	0,92
AZ222	52,29	52,20
AZ225,2	23,80	19,33
AZ227	23,12	35,08
B,SUBTILIS	82,59	47,86
B1	15,03	25,62
B11	31,16	36,37
B32	9,10	66,80
B48	38,68	82,34
B52	43,59	16,12
B6	45,81	45,14
BA130	68,58	100,18

CANB	47,74	22,45
CB1	15,24	3,08
CB2	36,08	37,43
CB3	38,41	27,56
CECT4344	9,05	17,27
CECT522	14,04	26,04
CECT525	69,05	53,25
CGCT	66,37	55,96
CH10,01	14,17	4,72
CH11,01	7,54	2,22
D1,99	2,63	0,38
D11,00	77,85	0,59
D16,99	24,85	36,72
D27,98	67,39	44,60
D29,03	73,28	8,25
D29,98	0,00	22,27
D30,98	62,34	32,85
D31,98	0,00	0,42
D35,01	21,18	63,71
D35,98	63,92	10,84
D84,98	54,52	36,00
DB13,99	11,04	2,18
DB17,99	0,00	0,90
DB56,02	11,43	21,83
DB6,98	17,65	28,34
DBASC1,98	33,99	68,74
DBASC2,98	11,04	14,25
DBASC3,98	0,03	0,04
DBASC4,98	3,98	1,22
DBASE2,98	73,24	24,46
DBASE3,98	10,72	15,99
DBH 8,97	50,24	33,22
DBH8,97	83,08	22,24
DC10,13	91,73	67,39
DC12R9	6,52	21,74
DC26F3	38,39	27,26
DC26F6	31,30	22,72
DC26F7	39,23	6,02
DC26T2	12,79	66,86
DC26T5	66,06	49,42
DC26T6	53,42	34,68
DC26T7	47,94	37,94
DC26T8	66,65	41,46
DC26T9	60,68	60,28
DC7R1	0,37	20,73

DC7R9	0,00	0,01
DCF12,1	26,68	30,29
DCF12,10	58,65	127,01
DCF12,2	75,66	178,73
DCF12,3	20,81	24,28
DCF12,4	49,83	16,99
DCF12,5	33,72	32,23
DCF12,6	97,83	47,59
DCF12,7	76,64	30,54
DCF12,9	91,14	141,45
DCF16,1	9,99	41,72
DCF16,10	41,83	35,32
DCF16,2	38,06	76,73
DCF16,3	58,74	43,32
DCF16,4	24,94	52,20
DCF16,5	70,67	52,13
DCF16,6	31,84	57,17
DCF16,7	35,04	48,70
DCF16,8	33,03	60,00
DCF16,9	44,08	73,71
DCF18,1	40,96	52,55
DCF18,10?	45,72	52,27
DCF18,11	37,50	77,71
DCF18,2	64,24	40,14
DCF18,3	79,17	6,78
DCF18,4	92,43	39,04
DCF18,5	67,90	38,34
DCF18,6	46,18	47,53
DCF18,7	0,51	54,71
DCF18,8	5,38	64,47
DCF18,9	17,18	77,57
DCF21,10	35,04	43,44
DCF21,7	51,96	61,37
DCF21,8	53,45	55,06
DCF21,9	26,43	39,12
DCF26F2	3,10	1,21
DCF6,1	11,75	34,19
DCF6,10	0,00	0,00
DCF6,2	38,00	49,51
DCF6,3	41,80	37,09
DCF6,4	47,26	61,92
DCF6,5	68,12	73,47
DCF6,6	64,75	75,67
DCF6,7	43,67	15,56
DCF6,8	4,28	14,77

DCF6,9	29,27	0,68
DCT12,1	39,04	12,81
DCT12,10	77,87	5,44
DCT12,11	25,62	10,15
DCT12,2	22,00	65,38
DCT12,2	74,33	23,59
DCT12,3	59,40	58,20
DCT12,4	17,69	65,48
DCT12,5	11,66	94,62
DCT12,5	99,04	34,40
DCT12,6	29,59	72,13
DCT12,7	31,72	58,20
DCT12,8	43,91	16,38
DCT12,9	18,83	19,02
DCT16,1	37,70	13,17
DCT16,10	46,56	4,26
DCT16,11	39,83	12,77
DCT16,2	80,40	53,24
DCT16,3	65,20	45,50
DCT16,4	38,11	31,22
DCT16,5	23,69	6,08
DCT16,6	19,19	17,89
DCT16,7	33,83	28,51
DCT16,8	44,94	25,72
DCT16,9	62,39	27,03
DCT18,1	82,88	41,04
DCT18,10	50,13	52,27
DCT18,2	47,46	26,73
DCT18,3	60,80	9,59
DCT18,4	41,86	18,12
DCT18,6	43,57	44,06
DCT18,7	50,28	45,16
DCT18,8	32,99	51,65
DCT18,9	26,50	67,38
DCT21,1	40,78	55,83
DCT21,10	30,18	25,77
DCT21,2	0,99	0,14
DCT21,3	35,45	28,17
DCT21,4	29,32	22,65
DCT21,5	42,11	48,00
DCT21,6	67,50	58,51
DCT21,7	53,97	55,02
DCT21,8	42,39	64,80
DCT21,9	36,63	43,19
DCT6,1	0,00	0,37

DCT6,10	10,31	20,39
DCT6,2	58,22	50,09
DCT6,4	92,79	19,47
DCT6,5	61,77	44,75
DCT6,6	65,80	19,12
DCT6,7	56,97	21,80
DCT6,9	23,36	18,97
DH10,97	9,91	24,89
DH10,99	85,37	64,85
DH19,99	0,00	0,00
DH26,98	45,76	3,10
DH33,01	82,67	29,02
DH34,01	1,66	9,25
DH35,01	29,00	48,15
DH36,01	0,58	6,45
DH37,01	17,27	41,93
DH5,01	10,34	59,20
DH5,99	54,10	52,22
DH55,02	0,63	1,43
DH8,98	26,97	4,67
DHB8,98	79,17	63,42
DI21	53,82	44,98
DI21S	30,50	86,22
DI2A	44,84	26,60
DP1HE2	66,63	62,78
DP1HE21915	35,97	61,11
DP1HE3	12,69	27,42
DP1HE4A	52,11	1,95
DP2H6	0,00	0,09
DR	17,42	21,01
DR5,2	13,65	35,59
DR6,01	0,17	15,87
DU2,01	44,62	80,87
DU3,01	20,03	6,58
DU4,01	80,34	9,55
ECOLI 13705	17,74	79,45
ENTF-OU	5,25	17,58
ERITROBACTER	0,00	0,00
ERM	80,29	108,31
FLAVOB,1,3,00	1,21	0,28
FLEXI	84,61	7,07
FLEXI,P65031	119,74	5,24
G2P	0,34	11,43
H1	5,39	7,55
H6	8,47	17,73

HB19	10,18	6,88
INT1	5,70	33,89
INT2	17,61	141,31
INT3	17,37	97,61
INT4	0,97	73,66
J-1/08	2,84	67,68
J-2/08	22,50	69,89
L,ANGILLARUM	5,51	67,24
L,JOHNSONI	0,02	4,47
L6,99	17,08	57,42
LB18,99	0,00	0,49
LB8,03	23,00	27,18
LBR10,99	11,02	8,16
LBRQ30,10	29,40	20,11
LG12,00	29,65	15,06
LG17,00	36,66	14,64
LG173,02	17,15	21,82
LG1C65,02	75,85	36,93
LG22,03	27,34	25,41
LG38,01	77,58	43,32
LG38,98	20,94	0,30
LG39,98	16,05	22,74
LG4,03	16,91	28,80
LG40,98	76,24	32,62
LG41,98	42,58	43,34
LG6,00	40,21	49,39
LG65,02	63,93	39,38
LG66,02	7,35	79,67
LG74,02	0,01	0,34
LG75,02	1,53	0,01
LG77,02	9,39	98,93
LGB1,05	20,43	43,93
LGB14,01	108,74	0,85
LGB27,02	19,70	40,19
LGB28,01	8,83	36,60
LGB29,01	15,33	32,80
LGB30,01	44,14	67,52
LGB32,03	51,66	15,29
LGB53,02	57,82	109,10
LGB6,02	88,07	55,83
LGB61,02	75,02	55,82
LGB7,05	131,50	48,51
LGB78,02	41,03	56,47
LGH V,ALGIN	18,72	22,55
LGH/00	29,31	35,69

LGH21,01	108,43	41,74
LGH21,03	23,89	34,19
LGH24,01	12,10	45,08
LGH28,01	0,71	0,53
LGH37,03	7,51	12,88
LGH40,03	18,44	16,88
LGH46,01	22,54	25,11
LGH6,05	144,93	30,66
LGH60,02	43,14	36,25
LGH60,02	66,44	31,34
LGH67,02	51,46	41,99
LGH69,02	53,51	79,52
LGLL63,02	50,08	47,59
LGR1,03	47,17	51,99
LGR10,03	89,69	77,14
LGR11,02	26,05	67,63
LGR13,01	53,74	3,41
LGR17,01	125,49	0,51
LGR18,01	16,61	21,36
LGR2,05	24,60	21,53
LGR31,01	0,06	3,63
LGR32,03	70,26	48,57
LGR38,03	13,37	8,96
LGR39,01	20,82	24,30
LGR5,05	102,35	38,62
LGR52,02	31,08	79,71
LGR53,01	26,73	66,75
LGR54,02	50,72	20,65
LGR62,02	79,66	28,55
LGR66,02	33,45	53,27
LGR70,02	43,51	83,57
LGR70,12	26,94	87,04
LGR72	16,24	40,06
LGR76,00	37,18	67,85
LGR9,01	38,85	1,40
LGU12,01	107,93	12,27
LGU15,01	14,06	44,56
LGU16,01	4,26	43,09
LGU19,01	2,37	30,77
LGU20,01	89,55	6,92
LGU20,03	20,20	0,00
LGU23,01	26,41	34,01
LGU25,01	104,12	10,66
LGU26	107,74	45,82
LGU26,01	60,05	28,72

LGU27,01	41,11	64,86
LGU32,01	22,15	36,80
LGU34,03	79,42	13,98
LGU4,00	34,45	12,71
LGU45,01	27,04	24,99
LGU47,01	19,10	14,81
LGU5,00	72,70	92,30
LGV3,05	54,38	30,25
LH14,00	47,01	59,01
LH22,98	119,82	36,64
LH23,98	28,82	23,01
LH24,98	4,40	2,05
LH25,98	129,03	3,92
LH27,03	61,03	52,10
LH28,03	51,72	32,20
LH29,03	19,44	15,83
LH8,01	0,52	13,71
LL1,03	81,66	73,37
LL10,98	0,00	0,00
LL11,98	3,69	3,90
LL12,98	30,67	28,87
LL13,98	0,07	0,00
LL14,98	0,29	0,00
LL15,03	31,84	41,78
LL16,98	40,45	17,83
LL2,03	39,49	43,41
LL2,98	82,33	41,21
LL25,03	5,94	0,66
LL26,03	36,40	29,49
LL3,03	43,08	49,60
LL3,98	1,86	0,02
LL9,98	74,44	37,17
LN5,03	4,25	16,68
LN7,03	7,78	9,43
LR4,03	88,38	26,43
LR6,03	38,97	36,96
LR9,03	35,15	35,51
LS1	19,07	1,40
LU7,01	0,15	0,00
LV1	5,60	9,64
LV5(1)	31,19	50,57
LVH(1)	39,93	32,91
M93SR	83,95	29,37
MICROCOCCUS	0,22	0,00
P1	25,32	6,72

P12	15,76	16,06
P13	1,89	36,01
P15	1,18	27,88
P16	6,03	20,29
P17	0,00	11,01
P17	82,10	25,18
P18	47,21	26,09
P19	22,27	26,01
P21	18,36	30,23
P22	21,22	6,40
P23	2,68	0,03
P24	14,17	19,43
P25	46,46	10,41
P26	22,60	39,97
P27	12,61	4,05
P28	32,83	21,32
P29	15,06	22,74
P3	5,35	0,89
P30	57,98	4,03
P32	22,14	23,35
P34	10,10	55,40
P36	8,08	65,36
P37	17,69	37,09
P38	18,42	38,02
P39	24,21	9,26
P44	106,15	15,81
P5	10,08	1,30
P53	0,00	4,47
P54	36,70	35,48
P57	33,71	27,25
P59	20,60	29,73
P67	71,47	4,77
P8	14,83	26,29
PD51G	36,08	101,25
PDB	40,31	77,83
PDB1	0,04	15,95
PDB2	0,14	54,63
PDB3	0,03	64,78
PDB4	0,00	0,72
PDI1	0,00	39,33
PDI2	26,92	45,62
PDI3	0,00	0,00
PDI4	16,50	45,62
PDI6	50,71	121,59
PDI7	19,89	68,93

PDP1	17,51	65,01
PDP10	61,97	44,06
PDP11	23,57	28,20
PDP12	70,89	26,06
PDP13	38,55	0,50
PDP14	48,58	58,72
PDP15	0,33	67,38
PDP16	52,75	4,84
PDP2	35,77	50,70
PDP3	20,20	22,40
PDP4	0,46	0,72
PDP5	0,33	42,03
PDP6	46,24	96,98
PDP7	120,56	3,45
PDP8	0,37	32,94
PDP9	3,33	69,20
PLI1	19,80	11,84
PLI2	26,86	19,46
PLI3	12,96	36,89
PLI4	38,36	30,03
PLP1	37,46	26,55
PLP2	58,98	8,20
PLP3	18,03	59,06
PLP4	40,24	35,55
PLP5	23,35	21,66
PLP6	24,40	30,73
PLP7	13,32	42,23
PLP8	22,78	44,07
PP1	28,25	52,50
PP5	79,05	22,96
PP7	0,00	0,92
PP8	17,65	92,70
PP8H	1,18	72,54
PS,AER,21,9	37,93	50,60
PS1	113,01	53,40
PSW10	20,96	35,24
PSW2	29,92	74,30
PSW3	40,69	109,50
PSW4	44,56	44,48
PSW5	16,31	86,34
PSW6	52,07	42,27
PSW7	5,52	31,28
PSW8	17,95	22,60
PSW9	8,07	30,40
R1M2	4,77	7,33

R6	0,00	0,61
RPH543,1	12,95	0,00
RPH549,1	46,60	0,00
S,TIPHI,	78,11	102,79
S1M1	8,50	57,53
S1M2	22,95	32,06
S1M3	19,25	9,14
S1M4	94,12	49,50
S1M5	27,89	23,57
S1M6	49,16	69,43
S2B1	66,66	64,29
S2B3	44,95	22,44
S2B4	125,86	111,99
S2M1	4,33	38,58
S2M2	41,71	54,28
S2M3	9,87	10,20
S2R1	67,59	80,63
S3M1	45,90	26,71
S3R1	52,23	47,04
S3R2	30,46	69,71
S3R3	17,77	30,11
SBR2	44,03	22,53
SBR3	31,54	33,81
SBR4	21,98	27,01
SBR5	39,78	41,37
TW493,02	80,10	30,41
V,ALGIN,	35,47	0,20
V,ALGINOL	123,08	43,62
V,PARAH	37,07	24,77
V,SPLENDIDUS	14,36	39,52
V,VULNIF	43,42	42,70
V1B571	1,98	18,49
VA1	3,63	29,90
VAC613	66,07	46,02
VB56,02	27,25	3,93
VIBRIO FISHERI	18,42	9,62
VIBRIO L2	79,51	3,99
VIBRIO V2	71,69	9,66
VSP1	15,62	23,24
VSP2	0,00	24,68
VSP7	17,21	12,44
WPY13,7,1,00	4,03	10,33
XC24,10	86,94	33,23
XCPUC	43,00	48,62
XM19	57,43	62,75

XSTS	49,50	45,54
YM19SW	27,19	95,09
YMH	30,95	45,75



ARTICULOS





Short communication

Identification of *Vibrio harveyi* proteins involved in the specific immune response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup)



A. Medina ^a, J.M. Mancera ^b, E. Martínez-Manzanares ^a, M.A. Moriñigo ^a, S. Arijo ^{a,*}

^a Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, Spain

^b Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, Campus de Excelencia Internacional del Mar, 11510 Puerto Real, Cádiz, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 June 2015

Received in revised form

10 September 2015

Accepted 14 September 2015

Available online 16 September 2015

Keywords:

Solea senegalensis

Vibrio harveyi

Immunization

Antibody

ELISA

2D-PAGE

Western Blot

Antigen identification

ABSTRACT

Senegalese sole cultures are frequently affected by *Vibrio harveyi* disease outbreaks. Vaccines in aquaculture are one of the most successful methods of preventing fish pathologies; however, these vaccines are usually composed of inactivated whole cells containing a wide pool of antigens, and some do not induce any protection against pathogens. Thus, the aim of this study was to identify immunogenic proteins of *V. harveyi* involved in the specific antibody production by Senegalese sole.

S. senegalensis specimens were immunized, by intraperitoneal injection, with *V. harveyi* bacterin supplemented with inactivated extracellular polymeric substances (ECP) and Freund incomplete adjuvant to obtain polyclonal antiserum. One month later, specimens were re-inoculated with the same antigens. Sera from immunized fish were collected two months post first immunization.

Strong specific immune response to *V. harveyi* antigens was detected by ELISA using bacterin (limit dilutions of sera were 1:64000), ECP (1:4000) and outer membrane proteins (OMP) (1:4000) as antigens.

Presence of immunogenic proteins in *V. harveyi* ECP and OMP were determined by 2D-PAGE. For Western Blot analysis some gels were transferred onto nitrocellulose membranes and incubated with sera from *S. senegalensis* specimens immunized against *V. harveyi*. 2D-PAGE and Western Blot showed at least five reactive proteins in the ECP and two in the OMP fraction. The spots that clearly reacted with the sole antiserum were excised from stained gel, and analyzed by mass spectrometry (MALDI/TOF/TOF). A database search was then performed, using MASCOT as the search method. According to the results, the five ECP spots were identified as Maltoporine, protein homologous to Metal dependent phosphohydrolase, two porins isoforms of *V. harveyi* and a protein homologous to the cell division protein FtsH. Reactive proteins in the OMP fraction were identified as the protein 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase and a protein homologous to acid phosphatase.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Senegalese sole cultures are frequently affected by *Vibrio harveyi* disease outbreaks [1,2]. Vaccines are one of the most successful methods of preventing fish pathologies [3]; however these vaccines are usually composed of inactivated whole cells containing a wide pool of antigens, and some of them do not induce any protection against pathogens [4]. Vaccines consisting of purified immunogenic antigens could induce higher protection than inactivated whole cells. Outer membrane proteins (OMP) and extracellular polymeric substances (ECP) of *V. harveyi* are good candidates for finding immunogenic antigens [5]. The ability to separate different proteins

by two-dimensional electrophoresis, Western blot and mass spectrometry (MS) are decisive in the identification of immunogenic proteins, providing the necessary data for the development of effective vaccines [6].

The aim of this study was to identify *V. harveyi* immunogenic proteins involved in the specific antibody production by Senegalese sole.

For this purpose, *Solea senegalensis* (Kaup) specimens were immunized, with *V. harveyi* bacterin (inactivated whole cells, used as a source of antigenic OMP) and ECP, to obtain polyclonal antiserum. The fish, (400 g mean body weight), were supplied by Servicios Centrales de Investigación de Cultivos Marinos (CASEM, University of Cádiz, Puerto Real, Spain). *V. harveyi* cells (strain Lg16.00) were grown in tryptic soy agar medium supplemented

* Corresponding author.

E-mail address: sarijo@uma.es (S. Arijo).



with 2% NaCl (TSAs) for 24 h at 22 °C. Bacterin was prepared with cells inactivated with formalin (1% v/v) [5], washed and suspended in PBS to 10^9 cells mL⁻¹. The ECP were obtained using the cellophane technique described by Liu [7]. Then, ECP (800 µg protein mL⁻¹) were inactivated by the addition of formalin (1% v/v, final concentration) and heating at 100 °C for 30 min. The inactivated ECP solution was finally mixed with the bacterin in a 1:10 ratio.

Fish (n = 10) were immunized with 0.1 mL of inactivated ECP-bacterin preparation mixed with 0.1 mL of Freund incomplete adjuvant (FIA; Sigma–Aldrich) (0.2 mL, total volume) by intraperitoneal injection (i.p.). One month later, fish received a booster of the same vaccine preparation. A group of non-immunized fish (n = 10) was used as negative control. One month after the second immunization, fish were anaesthetized, and blood was collected, allowed to clot to obtain sole antiserum, and stored at –80 °C. All the experiments complied with the European Union (2010/63/EU), and the Spanish Government (RD 53/2013) Guidelines for the use of laboratory animals.

The detection of specific antibody titers was carried out by ELISA [8]. Briefly, wells of microtiter plates (Nunc) were coated with the Lg16.00 bacterin, ECP or OMP (purified according to Lambert [9]). Strains Lg14.00 (*V. harveyi*), PDP11 (*Shewanella putrefaciens*) and Lg41.01 (*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) were also used as controls to determine the specificity of the reaction of immunized fish sera against *V. harveyi*.

Antigen-coated wells were sequentially incubated with serial dilutions of fish serum, rabbit antibody anti-sole immunoglobulin (1:1000), horseradish peroxidase-conjugated goat antibody anti-rabbit immunoglobulin (1:5000), and o-phenyldiamine dihydrochloride (Fast OP; Sigma–Aldrich) as developing solution. The reaction was stopped by addition of 3 M H₂SO₄, and absorbance was determined at 490 nm. The limit dilution method was used for the determination of the specific antibody titre (absorbance of the highest serum dilution ≥ average of negative control absorbance + 2 × negative control absorbance standard deviation) [10].

ELISA data showed a strong specific immune response by *S. senegalensis* specimens to the immunization with *V. harveyi* antigens. Limit dilutions of sera were 1:64,000 for *Vibrio harveyi* strains Lg14.00 and Lg16.00 bacterin, and 1:4000 for ECP and OMP. On the contrary, no significant differences in antibody titers were observed between Lg16.00-immunized and negative control sera when *S. putrefaciens* (PDP11) and *P. damsela* subsp. *piscicida* (Lg41.01) were used as antigens, thus indicating specificity between antiserum and *V. harveyi* antigens.

Two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE) and Western Blot analysis were carried out for the detection of immunogenic proteins in ECP and OMP. The 2D-PAGE gels were developed according to Görg et al. [11]. The proteins were added to 11 cm immobilized pH gradient strips (IPG, pH gradient 3–10, ReadyStrip IPG strips, Bio-Rad). Proteins in IPG strips were electrofocused using a Protean Isoelectrofocusing (IEF) Cell, (BioRad). IPG strips were embedded in 0.5% agarose (w/v) on top of 10% acrylamide gel. Second dimension separations were performed on an Omnipage platform (Cleaver Scientific) at 250 V. Proteins in the gels were fixed with 50% methanol and 10% acetic acid. The gels were silver stained (Protein Silver Plus, Sigma) and scanned at 700 ppi (GS-800, BioRad).

Western Blot Analysis was carried out according to the method described by Arijo et al. [5]. Gels were transferred onto 0.45 µm pore size nitrocellulose membranes (Sigma) by applying 300 mA for 60 min using transfer buffer in a semi-dry transblotter (BioRad). The membranes were incubated in Senegalese sole sera immunized against *V. harveyi* (dilution 1:400). Sera collected from non-immunized fish were used as negative control. After incubation,

membranes were sequentially incubated with rabbit anti-Senegalese sole Ig (1:1000), goat anti-rabbit Ig G horseradish peroxidase-conjugate (Sigma) diluted 1:5000, and developing solution (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB, Sigma). The reaction was stopped with distilled water.

A minimum of five strong immunogenic proteins (Spots) with molecular weights ranging from 30 kDa to 70 kDa were detected in *V. harveyi* ECP (Fig. 1); whilst two spots of 30 kDa molecular weight were highly reactive in OMP samples (Fig. 1). Membranes developed with non-immunized sera did not show any reactive protein by Western blot analysis.

In order to identify reactive proteins, 2D gels were scanned with GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad), and Quantity One software (Biorad) was used for gel analysis. The 2D image of the gel from each sample was compared with the Western Blot and spots that clearly reacted with the sole antiserum were selected.

Protein spots were manually excised, rinsed with distilled H₂O and subjected to in-gel digestion to extract proteins prior to mass spectrometry analysis. Peptides resulting from protein digestion were analyzed by mass spectrometry (MALDI/TOF–TOF, 4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems). A database search was then performed, combining the results of the fingerprint peptide (MS) with a fragmentation (MS/MS) of peptides from each spot according to the MS spectrum, using MASCOT as the search method [12].

Identification of reactive proteins is shown in Table 1. Spot ECP-1 was identified as a 3 Maltoporine. Maltoporine facilitates the translocation of maltodextrins across the outer membrane of Gram-negative bacteria. In particular, it is indispensable for the diffusion of large solutes such as maltooligosaccharides. The immunologic role is unknown in *V. harveyi* but it is well-known in other *Vibrio* species such as *Vibrio cholerae* (protein OmpS) [13]. In addition, the potentiality of this protein as vaccine antigen in *V. harveyi* can be borne out if we consider that protective immune response against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* has been reported after immunization with purified recombinant *A. hydrophila* maltoporine [14]. Spot ECP-2 was homologous (98.9%) to a Metal dependent phosphohydrolase which plays an important role in infection stages of some microbes [15]. Spots ECP-3 and ECP-4 were identified as porin isoforms of *V. harveyi*. Unfortunately there is no additional information in the proteomic microbe database for both spots. Porins form channels for small hydrophilic molecules and are involved in the transport of nutrients, antibiotics and other modulators [16]. In addition, porins have been reported to constitute relevant immunogenic components in *Vibrio* species [17–19]. Finally, spot ECP-5 was homologous (80.1%) to the cell division protein FtsH, a peptidase essential for effective adaptation in stress response [20]. Although these proteins are located in the cellular membranes, they have an extracellular domain; therefore, their detection in *V. harveyi* ECP might be due to sample contamination with lysed cells.

Regarding OMPs (Table 1), spot OMP-1 was identified as the protein 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase. 3-hydroxyisobutyrate is reversibly oxidized to methylmalonate semialdehyde by a membrane-bound 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase [21]. Also the protein is involved in lipid transport and valin metabolism. However the role in virulence of this enzyme and in the activation of fish immune systems has not been established yet. Finally, the spot OMP-2 was identified as an acid phosphatase protein. Acid phosphatase (AP) activity has been described in *Vibrio* species [22–24]. This enzymatic activity has an important role in bacterial proliferation [25] by the blockage of host-derived reactive oxygen species produced by neutrophils, allowing the microbe to avoid phagocytosis and contributing to its pathogenicity [26]. Further studies are required to confirm whether AP is a virulence factor in *Vibrio* sp.

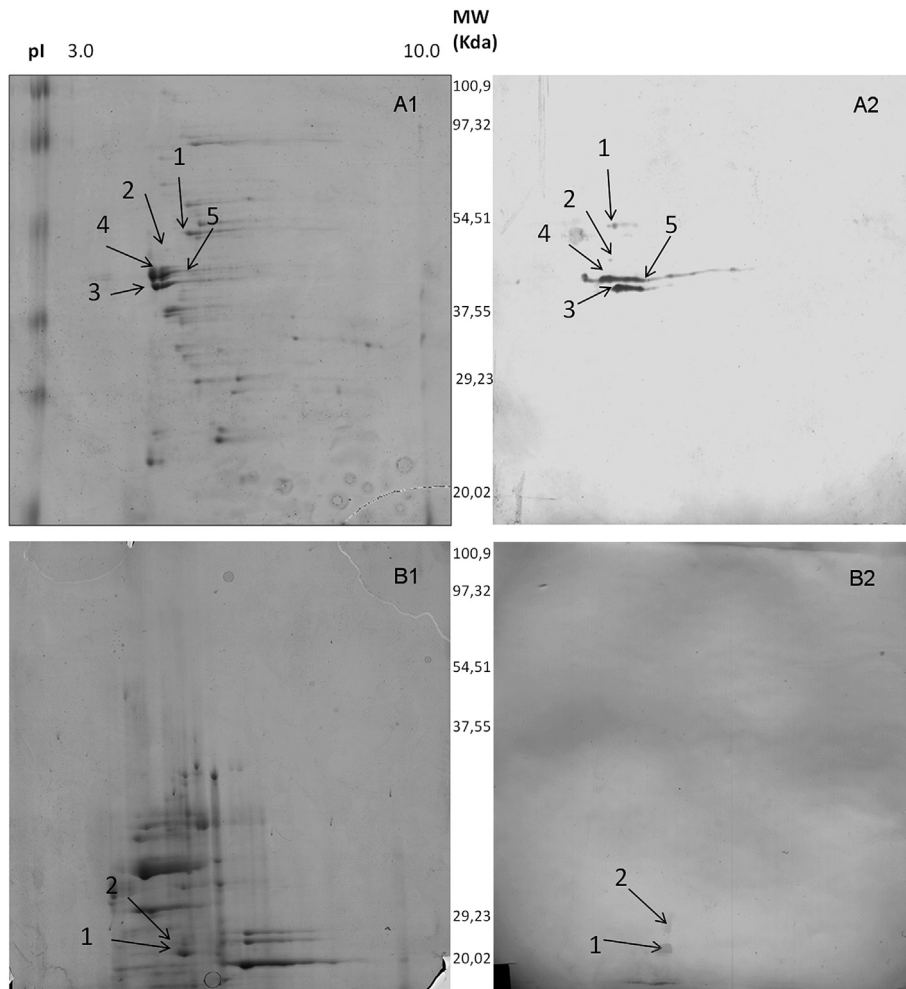


Fig. 1. 2D-PAGE gels (left) and Western blot membranes (right) of *V. harveyi* proteins. (A1) ECP spots observed on 2D-PAGE gels; (A2) ECP spots on Western Blot membrane, reactive with serum from *S. senegalensis* specimens immunized against *V. harveyi*. (B1) OMP spots on 2D-PAGE gels. (B2) OMP spots on Western Blot membrane, reactive with serum from *S. senegalensis* specimens immunized against *V. harveyi*. ECP-1: Maltoporin; ECP-2: Metal dependent phosphohydrolase; ECP-3 and ECP-4: *V. harveyi* porins; ECP-5: Cell division protein FtsH; OMP-1: 3-hydroxy-isobutyrate dehydrogenase; OMP-2: *V. harveyi* Acid phosphatase.

Table 1

ECP and OMP spots isolated from *V. harveyi* by 2D-PAGE and identified with confidence by MASCOT (confidence interval > 80%). MW: molecular weight; PI: isoelectric point; and Accession number according the National Center for Biotechnology (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Sample	Protein	Specie	Protein score	Confidence interval	Protein MW	PI	Accession number
ECP-1	Maltoporin	<i>Vibrio harveyi</i>	203	100	49.6	4.40	gi 156976051
ECP-2	Metal dependent phosphohydrolase	<i>Vibrio orientalis</i>	74	98.9	30.4	5.54	gi 261250101
ECP-3	Porins	<i>Vibrio harveyi</i>	469	100	34.64	4.16	gi 237846491
ECP-4	Porins	<i>Vibrio harveyi</i>	634	100	34.64	4.16	gi 237846491
ECP-5	Cell division protein FtsH	<i>Photobacterium profundum</i>	62	80.1	76.89	5.14	gi 54307809
OMP-1	3-hydroxy-isobutyrate dehydrogenase	<i>Vibrio harveyi</i>	391	100	23.64	5.48	gi 269964136
OMP-2	Acid phosphatase	<i>Vibrio harveyi</i>	519	100	37.18	5.35	gi 153833305

In conclusion, the proteins identified in this study can be considered as potential candidates in the design of vaccines for *S. senegalensis* against *V. harveyi*. However, further studies are necessary to determine the level of protection conferred to fish specimens by these antigens.

Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Science of Spain (Plan Nacional de Investigación, AGL2010-17789) and the European Regional Development Fund. Authors would like to thank Servicios

Centrales de Investigación de Cultivos Marinos (CASEM, Universidad de Cádiz, Puerto Real, Spain) for providing experimental fish.

References

- [1] B. Austin, X.-H. Zhang, *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates, Lett. Appl. Microbiol. 43 (2006) 119–124, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x>.
- [2] S. Arijo, R. Rico, M. Chabrillon, P. Diaz-Rosales, E. Martínez-Manzanares, M.C. Balebona, et al., Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, J. Fish. Dis. 28 (2005) 33–38, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00597.x>.

- [3] B. Magnadóttir, Immunological control of fish diseases, *Mar. Biotechnol.* 12 (2010) 361–379, <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-010-9279-x>.
- [4] B. Björnisdóttir, S. Gudmundsdóttir, S.H. Bambir, B.K. Gudmundsdóttir, Experimental infection of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), by *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* and evaluation of cross protection induced by a furunculosis vaccine, *J. Fish. Dis.* 28 (2005) 181–188, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00617.x>.
- [5] S. Arijó, J. Brunt, M. Chabrilón, P. Díaz-Rosales, B. Austin, Subcellular components of *Vibrio harveyi* and probiotics induce immune responses in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *V. harveyi*, *J. Fish. Dis.* 31 (2008) 579–590, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.00932.x>.
- [6] S. Hanash, 2-D or not 2-D—is there a future for 2-D gels in proteomics? Insights from the York proteomics meeting, *Proteomics* 1 (2001) 635–637.
- [7] P.V. Liu, Survey of hemolysin production among species of pseudomonads, *J. Bacteriol.* 74 (1957) 718–727.
- [8] P.A.W. Robertson, H.-S. Xu, B. Austin, An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Vibrio harveyi* in penaeid shrimp and water, *J. Microbiol. Methods* 34 (1998) 31–39, [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(98\)00066-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(98)00066-9).
- [9] P.A. Lambert, Enterobacteriaceae: composition, structure and function of the cell envelope, *J. Appl. Bacteriol.* 65 (1988) 215–245, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb04643.x>.
- [10] H.U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, M. Grassl, *Methods of Enzymatic Analysis: Samples, Reagents, Assessment of Results*, Verlag Chemie, 1983.
- [11] A. Görg, W. Weiss, M.J. Dunn, Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics, *Proteomics* 4 (2004) 3665–3685, <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200401031>.
- [12] P. Wilmes, P.L. Bond, The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms, *Environ. Microbiol.* 6 (2004) 911–920, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00687.x>.
- [13] H. Lång, M. Mäki, A. Rantakari, T.K. Korhonen, Characterization of adhesive epitopes with the OmpS display system, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 163–170.
- [14] R.M. Khushiramani, B. Maiti, M. Shekar, S.K. Girisha, N. Akash, A. Deepanjali, et al., Recombinant *Aeromonas hydrophila* outer membrane protein 48 (Omp48) induces a protective immune response against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda*, *Res. Microbiol.* 163 (2012) 286–291, <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2012.03.001>.
- [15] C. Kaito, K. Kurokawa, Y. Matsumoto, Y. Terao, S. Kawabata, S. Hamada, et al., Silkworm pathogenic bacteria infection model for identification of novel virulence genes, *Mol. Microbiol.* 56 (2005) 934–944, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04596.x>.
- [16] S.R. Chakrabarti, K. Chaudhuri, K. Sen, J. Das, Porins of *Vibrio cholerae*: purification and characterization of OmpU, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 524–530.
- [17] J. Mathur, M.K. Waldor, The *Vibrio cholerae* ToxR-regulated porin OmpU confers resistance to antimicrobial peptides, *Infect. Immun.* 72 (2004) 3577–3583, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.6.3577-3583.2004>.
- [18] Z. Mao, L. Yu, Z. You, Y. Wei, Y. Liu, Cloning, expression and immunogenicity analysis of five outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* zj2003, *Fish. Shellfish Immunol.* 23 (2007) 567–575, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2007.01.004>.
- [19] H.-Y. Pang, Y. Li, Z.-H. Wu, J.-C. Jian, Y.-S. Lu, S.-H. Cai, Immunoproteomic analysis and identification of novel immunogenic proteins from *Vibrio harveyi*, *J. Appl. Microbiol.* 109 (2010) 1800–1809, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04808.x>.
- [20] S. Langklotz, U. Baumann, F. Narberhaus, Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH, *Biochim. Biophys. Acta* 1823 (2012) 40–48, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.08.015>.
- [21] R.W. Titball, J.F. Petrosino, *Francisella tularensis* genomics and proteomics, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1105 (2007) 98–121, <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1409.015>.
- [22] I.D. Ridgway, H.J. Small, R.J.A. Atkinson, H.T. Birkbeck, A.C. Taylor, D.M. Neil, Extracellular proteases and possible disease related virulence mechanisms of two marine bacteria implicated in an opportunistic bacterial infection of *Nephrops norvegicus*, *J. Invertebr. Pathol.* 99 (2008) 14–19, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2008.05.007>.
- [23] R.B. Hidalgo, I. Cleenwerck, S. Balboa, S. Prado, P.D. Vos, J.L. Romalde, *Vibrio breoganii* sp. nov., a non-motile, alginate, marine bacterium within the *Vibrio haliotocoli* clade, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59 (2009) 1589–1594, <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.003434-0>.
- [24] S.A. Soto-Rodríguez, B. Gomez-Gil, R. Lozano, R. del Rio-Rodríguez, A.L. Diéguez, J.L. Romalde, Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “Bright-red” Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *J. Invertebr. Pathol.* 109 (2012) 307–317, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.006>.
- [25] A.K. Saha, J.N. Dowling, K.L. LaMarco, S. Das, A.T. Remaley, N. Olomu, et al., Properties of an acid phosphatase from *Legionella micdadei* which blocks superoxide anion production by human neutrophils, *Arch. Biochem. Biophys.* 243 (1985) 150–160.
- [26] H.J. Small, J.D. Shields, D.M. Neil, A.C. Taylor, G.H. Coombs, Differences in enzyme activities between two species of Hematodinium, parasitic dinoflagellates of crustaceans, *J. Invertebr. Pathol.* 94 (2007) 175–183, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2006.10.004>.