

Brenda del Socorro Mora Sánchez

Herramientas de control biológico
para la prevención de la
lactococosis en el cultivo de la
trucha arcoíris (*Oncorhynchus
mykiss*).

Director/es

Pérez Sánchez, Tania
Balcázar Rojas, José Luis

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

HERRAMIENTAS DE CONTROL BIOLÓGICO PARA
LA PREVENCIÓN DE LA LACTOCOCOSIS EN EL
CULTIVO DE LA TRUCHA ARCOÍRIS
(ONCORHYNCHUS MYKISS).

Autor

Brenda del Socorro Mora Sánchez

Director/es

Pérez Sánchez, Tania
Balcázar Rojas, José Luis

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2021



Universidad de Zaragoza
Facultad de Veterinaria
Departamento de Patología Animal



**Herramientas de control biológico para la prevención de
la lactococosis en el cultivo de trucha arcoíris
(*Oncorhynchus mykiss*)**

Memoria presentada por **Brenda del Socorro Mora Sánchez**
Para optar al grado de Doctor
Julio 2020

Dra. TANIA PÉREZ SÁNCHEZ, Investigadora del Instituto Agroalimentario de Aragón, y
Dr. JOSÉ LUIS BALCÁZAR ROJAS, Investigador del Grupo de Microbiología del Institut
Català de Recerca de l'Aigua, como Directores,

C E R T I F I C A N :

Que D^a. BRENDA DEL SOCORRO MORA SÁNCHEZ ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos correspondientes a su Tesis Doctoral titulada “Herramientas de control biológico para la prevención de la lactococosis en el cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)” que se ajusta con el Proyecto de Tesis presentado y cumple las condiciones exigidas para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que autorizan su presentación como compendio de publicaciones para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, firmamos el presente certificado

En Zaragoza, a 27 de julio de 2020

Dra. T. Pérez Sánchez

Dr. J.L. Balcázar Rojas

“Y aunque corrijo muchas veces en la pantalla, sé que en algún momento hay que imprimir esa página para llevarla al mundo real del papel, y entonces, armado de un haz de lápices afilado empezar a corregir, a luchar cuerpo a cuerpo con las palabras hasta el amanecer, como Jacob con el ángel, hasta derrotarlas”

Sergio Ramírez

DEDICADA
Al dueño de mi vida y a mi familia

Agradecimientos

Este trabajo se realizó gracias al apoyo de Universidad de Zaragoza a través del Vicerrectorado de Relaciones Internacionales y Cooperación al Desarrollo, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, Departamento de Patología Animal, Unidad de Infecciosas, que facilitaron un espacio, instalaciones y equipos para desarrollar esta tesis.

También agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-León), Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación, Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León.

Al financiamiento recibido por el Banco Santander a través del programa “Ayudas de movilidad para estudios de doctorado a estudiantes Iberoamericanos, Universidad de Zaragoza/Banco Santander” por un período de dos años.

Agradezco de manera muy especial a mi tutor, el Dr. José Luis Múzquiz Moracho, uno de los pilares fundadores de nuestra Escuela de Veterinaria en Nicaragua, por haberme brindado su amistad, consejos y su solidaridad.

Quiero mencionar mi agradecimiento al apoyo incondicional y coordinación de mis directores, Dra. Tania Pérez Sánchez ejemplo de perseverancia y responsabilidad, quien fue la persona con la que pasé mayor tiempo de mi estancia en España y que vivimos experiencias que nos ayudaron a ser más fuertes como seres humanos a pesar de todos los intentos fallidos y las adversidades puestas en el camino. Al Dr. José Luis Balcázar Rojas por su apoyo incondicional, por la dedicación a este trabajo, por ser una persona con un gran espíritu humano, sinceramente gracias por guiarme.

Mis más sinceros agradecimientos a mi estimado amigo Dr. Juan José Badiola, por todo el cariño y consejos, por formar parte del equipo que un día fundaron nuestra querida Escuela de Veterinaria en Nicaragua.

Al Dr. Héctor Fuertes por su amistad y por compartir juntos el despacho de becarios.

A los doctores Jesús García y Carmelo Ortega por su solidaridad y amistad.

A la Dra. Olivia Gironés Puñet por su cariño, su amistad y consejos, por los momentos agradables que pasamos en aquellas vacaciones de verano y por otras muchas ocasiones más.

Al Dr. Daniel Vendrell Pérez por su amistad, sus palabras de ánimos cuando las cosas eran muy difíciles, por todas las veces que me brindó su apoyo en el trabajo realizado en la piscifactoría.

A Jesús Orós mi amigo quien siempre me brindó su amistad y compartió conmigo su conocimiento.

A mi familia CEVEDI, mi equipo de investigación, la Dra. Jessica Sheleby, por su amistad por darme palabras de ánimos, por ayudarme en los momentos que más necesité, a mi amigo, mi hermano negro Dr. Byron Flores por todo su apoyo incondicional en las buenas y en las malas. A mi amiga Dra. Christiane Düttmann quien me enseñó a seguir adelante, a Dayana por su amistad y su apoyo, a mi jefe y amigo Dr. William Jirón por apoyarme en el desarrollo de mis estudios.

A mi familia por el apoyo incondicional, porque supieron sobrellevar y comprender esos momentos que estuve desconectada y lejos de todo, por ese tiempo y espacio que me dieron para poder lograr este objetivo, por llorar conmigo y por sonreír conmigo.

Pero sobre todo agradezco a **“Dios”** por ser el timón de mi vida y porque todo se lo debo a él.

¡A todos eternamente ...Gracias!

Índice

Índice.....	I
1. Resumen / Summary.....	III
2. Justificación	1
3. Introducción.....	3
3.1. Justificación de la unidad temática de las publicaciones	3
3.2. Desarrollo de la acuicultura a nivel mundial.....	5
3.3. Estado de la producción acuícola en España	6
3.4. Lactococosis	6
3.5. Restricción del uso de antibióticos en acuicultura	12
3.6. Fitobióticos	14
3.6.1. Ventajas del uso de los fitobióticos	16
3.6.2. Desventajas del uso de los fitobióticos.....	17
3.7. Probióticos	18
3.7.1. Mecanismos de acción de los probióticos	20
3.7.2. Ventajas del uso de probióticos	20
3.7.3. Desventajas del uso de probióticos.....	21
3.8. Postbiótico	22
3.8.1. Mecanismos de acción de los postbióticos sobre el huésped	23
3.8.2. Propiedades terapéuticas de los postbióticos	23
3.8.3. Postbióticos en diferentes especies de animales.....	24
3.8.4. Postbióticos como una alternativa segura.....	26
4. Publicaciones	29
4.1. Artículo de revisión	31
4.2. Artículo original I	41
4.3. Artículo original II	47
4.4. Artículo original III	55
4.5. Artículo original IV.....	61
5. Objetivos.....	67
5.1. Objetivos de los trabajos presentados	67
6. Metodología	71
6.1. Aspectos generales de los procedimientos	71
6.1.1. Obtención y traslado de los peces.....	71
6.1.2. Grupos de peces	72
6.1.3. Medición de peso inicial	72

6.1.4. Aclimatación y desinfección	72
6.1.5. Parámetros físicos y químicos del agua	73
6.1.6. Bacteria patógena.....	73
6.1.7. Infección con el patógeno	74
6.1.8. Etapa <i>in vivo</i>	74
6.1.9. Número de peces sacrificados	74
6.1.10. Eutanasia.....	75
6.1.11. Extracción del ADN	75
6.1.12. Secuenciación	75
6.2. Evaluación de Biocitro®	76
6.2.1. Etapa <i>in vitro</i>	76
6.2.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI)	77
6.2.3. Interpretación de la CMI	77
6.2.4. Dieta administrada	77
6.3. Evaluación de un nuevo postbiótico	78
6.3.1. Obtención del postbiótico.....	78
6.3.1.1. Primera fase	78
6.3.1.2. Segunda fase	78
6.3.2. Dieta administrada	78
6.4. Combinación de dos postbióticos	78
6.4.1. Obtención de la dieta experimental	79
6.4.1.1. Primera fase	79
6.4.1.2. Segunda fase	79
6.5. Análisis filogenético.....	79
6.5.1. Peces seleccionados	79
6.5.2 Comparación filogenética	79
7. Discusión general	81
8. Conclusiones / Conclusions	87
9. Bibliografía.....	91
10. Apéndices	111
10.1. Características de las revistas	111
10.2. Contribución de la doctoranda	113
10.3. Procedimientos de experimentación	117

1. Resumen / Summary

Resumen

En los últimos años, la acuicultura ha experimentado un desarrollo importante a nivel mundial, generando con su expansión la presencia de enfermedades provocadas principalmente por agentes bacterianos, las cuales han sido controladas tradicionalmente mediante el uso de antibióticos para disminuir las pérdidas económicas en los cultivos acuícolas. Sin embargo, los métodos utilizados hasta el día de hoy en el control de estas enfermedades han repercutido de manera negativa en la salud humana, generando resistencia antimicrobiana e impacto negativo en el medio ambiente, siendo una de las principales preocupaciones, no solo para el sector acuícola sino también para la salud pública. Para dar respuesta a esta problemática se requieren estrategias alternativas que permitan controlar los patógenos sin los efectos colaterales que regularmente producen los antibióticos.

Basándonos en una actualización de datos que realizamos, pudimos evidenciar la existencia de resultados satisfactorios del uso de fitobióticos, como una alternativa terapéutica demostrando su capacidad inhibitoria frente a diferentes patógenos bacterianos en distintas especies de animales acuícolas. De igual manera el uso de postbióticos, a pesar de ser una estrategia reciente, los pocos estudios demuestran que es una alternativa prometedora y segura.

Esta tesis tiene como finalidad evaluar el uso de alternativas que consideramos podrían ser empleadas para el control del agente infeccioso *L. garvieae*, que afecta principalmente al cultivo de trucha arcoíris, causante de grandes pérdidas económicas.

En primer lugar, se realizó una actualización de las ventajas y desventajas sobre el uso de estrategias biológicas en el control de agentes patógenos, para prevenir y controlar las enfermedades presentes en cultivos acuícolas.

De igual manera evaluamos la capacidad inhibitoria del producto comercial Biocitro®, demostrando su efecto inhibitorio frente a *L. garvieae* en cultivo de trucha arcoíris.

Consideramos también importante evaluar un nuevo postbiótico, obtenido de la fermentación de una cepa ácido láctica del género *Lactobacillus*, demostrando su capacidad inhibitoria frente al patógeno en estudio.

Posteriormente evaluamos una dieta suplementada con un postbiótico, obtenida de la fermentación de dos bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, que provocó un aumento en la diversidad de la microbiota intestinal en los peces y proporcionó protección frente a *L. garvieae*.

Finalmente, realizamos un análisis filogenético de la microbiota intestinal en salmónidos, en el que se encontró un nuevo filotipo de *Mycoplasma*, y al mismo tiempo expresamos la necesidad de llevar a cabo más estudios que permitan evaluar el beneficio que éste pueda causar en la salud de los peces.

Summary

In the last few years, aquaculture has experienced a great development worldwide, whose intensification has led to the occurrence of diseases, mainly caused by bacterial pathogens, which have been traditionally controlled through the use of antibiotics to reduce economic losses. However, the common therapeutic methods used to control these diseases have had a negative impact on human and environmental health due to antimicrobial resistance, being one of the main concerns, not only for aquaculture but also for global public health. To respond to this problem, alternative strategies are required to control pathogens without the side-effects that antibiotics have.

Based on an update of the available information, we were able to demonstrate satisfactory results from the use of phytobiotics as a therapeutic alternative, particularly their inhibitory capacity against bacterial pathogens in different species of aquaculture interest. Similarly, the use of postbiotics has shown promising results, despite being a recent strategy.

The aim of this thesis was therefore to evaluate the use of alternatives for the control of infectious agents such as *L. garvieae*, which mainly affects the culture of rainbow trout, thereby causing great economic losses.

Firstly, we performed an update of the advantages and disadvantages on the use of biological control strategies to prevent and control diseases in fish farming.

Likewise, we evaluated the inhibitory capacity of the commercial product Biocontro®, demonstrating its inhibitory effect against *L. garvieae* in rainbow trout. We also consider important to evaluate a new postbiotic, obtained from fermentation with a lactic acid bacterium belonging to the genus *Lactobacillus*, demonstrating its inhibitory capacity against *L. garvieae*.

Subsequently, we evaluated a diet supplemented with a postbiotic, obtained from fermentation with two lactic acid bacteria belonging to genera *Lactobacillus* and *Leuconostoc*, which led to an increased diversity of the intestinal microbiota in fish and provided protection against *L. garvieae*.

Finally, we conducted a phylogenetic analysis of the intestinal microbiota in salmonids, in which a new phylotype of *Mycoplasma* was found. We also expressed the need for further studies to assess the benefit that this novel phylotype may cause to fish health.

2. Justificación

La presente tesis doctoral está formada por un compendio de publicaciones que incluye un artículo de revisión y cuatro artículos originales, todos ellos publicados en revistas científicas indexadas. Los artículos incluidos en la tesis pertenecen a la misma línea de investigación, enmarcada en el desarrollo de estrategias alternativas al uso de antibióticos para el control de enfermedades en el cultivo de la trucha arcoíris. Se detallan a continuación las referencias bibliográficas de los artículos mencionados que forman parte de esta tesis doctoral:

Pérez-Sánchez T., Mora-Sánchez B., Balcázar J.L. 2018. Biological approaches for disease control in aquaculture: Advantages, limitations and challenges. *Trends in Microbiology* 26, 896–903.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.002>

Mora-Sánchez B., Fuertes H., Balcázar J.L., Pérez-Sánchez T. 2020. Effect of a multi-citrus extract-based feed additive on the survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following challenge with *Lactococcus garvieae*. *Acta Veterinaria Scandinavica* 62, 38.

<https://doi.org/10.1186/s13028-020-00536-0>

Mora-Sánchez B., Balcázar J.L., Pérez-Sánchez T. 2020. Effect of a novel postbiotic containing lactic acid bacteria on the intestinal microbiota and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biotechnology Letters* 42, 1957–1962.

<https://doi.org/10.1007/s10529-020-02919-9>

Pérez-Sánchez T., Mora-Sánchez B., Vargas A., Balcázar J.L. 2020. Changes in intestinal microbiota and disease resistance following dietary postbiotic supplementation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Microbial Pathogenesis* 142, 104060.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104060>

Mora-Sánchez B., Pérez-Sánchez T., Balcázar J.L. 2020. Phylogenetic analysis of intestinal microbiota reveals novel *Mycoplasma* phylotypes in salmonid species. *Microbial Pathogenesis* 145, 104210.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104210>

3. Introducción

3.1. Justificación de la unidad temática de las publicaciones

Aunque la producción de trucha arcoíris ha experimentado un crecimiento exponencial en varios países desde mediados del siglo pasado, su intensificación durante los últimos años se ha visto desfavorecida por la presencia de enfermedades infecciosas, que en el caso de las de origen bacteriano en el cultivo de trucha arcoíris, al igual que otras especies de interés acuícola, han sido usualmente tratadas con antibióticos. No obstante, el uso desmesurado de estos compuestos, incluyendo aquellos utilizados como promotores de crecimiento, ha favorecido la selección y diseminación de resistencia bacteriana que puede comprometer seriamente la salud humana, animal y ambiental (Cabello *et al.*, 2013). Debido a sus implicaciones, algunos países han establecido medidas para restringir el uso de estos fármacos, por lo que resulta necesaria la búsqueda de nuevas alternativas que permitan la prevención y/o control de enfermedades bacterianas.

Con el desarrollo de esta investigación se pretende proponer las pautas para el inicio de una nueva era en el control de las enfermedades bacterianas, para que esta actividad se siga desarrollando con éxito sin producir consecuencias negativas y con un mayor rendimiento en la producción. Se detallan dichas actividades en los siguientes cinco artículos.

Consideramos necesario, antes de iniciar con el trabajo experimental de esta tesis, realizar una revisión de todos los métodos alternativos utilizados actualmente de manera segura y responsable, al igual que las ventajas e inconvenientes, con el fin de realizar experiencias basándonos en los antecedentes de estos trabajos. Dicha revisión fue publicada en la revista *Trends in Microbiology*.

La recopilación de la información en el primer artículo nos permitió evidenciar que los extractos de plantas pueden ser útiles en el control de enfermedades bacterianas. Basándonos en estos antecedentes procedimos a desarrollar un estudio que evaluara la capacidad inhibitoria de un compuesto natural de extractos a base de cítricos cuyo nombre comercial es Biocitro®. Los detalles de estos resultados se abordan en un segundo artículo.

Dicho estudio fue dividido en dos etapas. En la primera de ellas, evaluamos la actividad inhibitoria *in vitro* de Biocitro® frente a varios de los principales patógenos que afectan el cultivo de trucha arcoíris, tales como *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* y *Aeromonas salmonicida*, obteniendo resultados satisfactorios que permitieron llevar la experiencia a un enfrentamiento *in vivo*. En esta segunda etapa se realizó el desafío con *L. garvieae*, el cual es el agente etiológico de la lactococosis y responsable de graves pérdidas económicas en la producción de trucha arcoíris. En esta fase, el producto fue administrado como un ingrediente en la dieta y como resultado de ambas etapas se demostró que este producto comercial puede ser considerado una alternativa prometedora para el control de la lactococosis.

Existen muchos estudios que demuestran que el uso de cepas probióticas es una estrategia prometedora (Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). Sin embargo, el proceso de fabricación del pienso a altas temperaturas podría hacer que éstos pierdan su viabilidad, además debe considerarse que la administración de microorganismos vivos puede causar efectos adversos en la salud del huésped con un sistema inmunitario comprometido y puede promover la transferencia de genes que confieren resistencia a los antibióticos (Taverniti y Guglielmetti, 2011).

Con el propósito de encontrar alternativas responsables que puedan ser usadas de manera segura, presentamos un tercer artículo en el que se reflejan los resultados después de realizar una experiencia *in vivo* que permitiera evaluar la capacidad protectora frente al patógeno *L. garvieae*, después de una alimentación con un nuevo postbiótico obtenido como un pienso complementario fermentado con *Lactobacillus plantarum*. Esta experiencia demostró el efecto inhibitorio del postbiótico obtenido frente al patógeno en estudio, además de incrementar la biodiversidad de la microbiota intestinal en trucha arcoíris.

Hasta hoy son pocos los estudios que demuestran que el uso de postbióticos administrados en la dieta podría ser considerado una alternativa a los antibióticos. Esta fue una de las principales razones que nos llevó a realizar una experiencia *in vivo* en trucha arcoíris, mediante la obtención de un postbiótico procedente de dos bacterias ácido lácticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. La administración del postbiótico en comparación al grupo control provocó en los peces

un cambio beneficioso en la microbiota intestinal, al igual que un efecto inhibitorio y protector frente al patógeno *L. garvieae*, cuyos resultados están publicado en un cuarto artículo.

Dentro de nuestra temática de investigación, realizamos un quinto artículo que recoge los resultados obtenidos del análisis filogenético de la microbiota intestinal de especies de salmónidos, en el que se encontró un nuevo filotipo del género *Mycoplasma*. Aunque las muestras fueron tomadas de peces aparentemente sanos y sin ningún tratamiento, recomendamos la necesidad de seguir investigando sobre los efectos de este nuevo filotipo en salmónidos.

3.2. Desarrollo de la acuicultura a nivel mundial

La acuicultura es una de las prácticas económicas más antiguas, considerada al inicio como la cría de peces en estanques. Sin embargo, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) describe a la acuicultura como el cultivo de peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas (FAO, 2010).

La FAO estima que para el año 2050, el número de habitantes a nivel mundial será de aproximadamente 9.600 millones, lo que provocará una mayor demanda de alimentos. Considerando que la acuicultura es una alternativa prometedora para disminuir la falta de alimentos ocasionada por este incremento de la población, las granjas que se dedican a esta actividad se verán obligadas a aumentar aún más su producción (FAO, 2009; FAO, 2018).

La Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos (APROMAR) refleja en su informe anual del año 2019, que fueron consumidos 13 millones de toneladas de productos acuícolas, una cantidad superior a la del año anterior. También detalla que la cantidad de producción acuícola obtenida en Asia fue del 92 %, mientras en América alcanzó un 3,2 %, en Europa un 2,9 %, en África un 2,0 % y Oceanía un 0,7 %, siendo China con 64,4 millones, Indonesia con 15,9 millones y la India con 6,2 millones los tres principales países con mayor producción en toneladas. Los mercados con mayor demanda se ubicaron en España, Estados Unidos y Japón, representando aproximadamente el 64% del valor total de las importaciones mundiales de pescado y productos pesqueros (APROMAR, 2019).

3.3. Estado de la producción acuícola en España

Actualmente la acuicultura en España se ha convertido en una vía que permite mantener e incrementar el consumo de organismos acuícolas, satisfaciendo las demandas de alimento y generando fuentes de empleo.

España se encuentra entre los principales países que presentó un incremento en la producción acuícola durante los últimos años. Una de las características que más favorece que España haya alcanzado esta alta producción es su disponibilidad de recursos hídricos. Así, a los casi 8.000 km de costa se suman varios ríos extensos, lagos, aguas embalsadas y diversidad de climas que proporcionan las condiciones idóneas para el desarrollo de la acuicultura.

El incremento en su producción ha ayudado a la sostenibilidad de la demanda creciente en el país. Es importante mencionar que la producción acuícola ha reducido la presión en las poblaciones de peces salvajes, por lo que es muy probable que la acuicultura pronto superará a la pesca de captura como principal fuente de alimento (FAO, 2018).

Para el año 2018, España aportó al mercado un total de 348.395 toneladas de producto acuícola, lo que generó un ingreso económico de 472,3 millones de euros. Durante los últimos años la principal especie producida ha sido el mejillón, alcanzando un total de 273.600 toneladas. En cuanto a la producción de peces podemos observar el aumento en la lubina, cultivándose en el año 2018 un total de 22.460 toneladas. La trucha arcoíris que ha venido incrementando en los últimos años su producción, alcanzó 18.856 toneladas en 2018 (un 5,1 % más que el año previo), y por último de la dorada se obtuvieron 14.930 toneladas (APROMAR, 2019).

3.4. Lactococosis

La lactococosis es causada por *L. garvieae*, el cual afecta a diversas especies de peces de agua dulce, salobre y marina, repercutiendo en importantes pérdidas económicas (Bercovier *et al.*, 1997). Entre ellas, la trucha arcoíris es una de las especies más sensible, siendo España, Italia, Francia, y en menor proporción, Reino Unido, Sudáfrica, Japón, Taiwán y Australia, los principales países afectados por la presencia

de esta patología debido a la intensificación en el cultivo de esta especie (Vendrell *et al.*, 2006).

La presencia del agente infeccioso en las piscifactorías no implica necesariamente la aparición de un brote. Hay diferentes factores involucrados en el desarrollo del proceso infeccioso, tales como la especie hospedadora, el estadio de desarrollo, condiciones ambientales, mala calidad del agua causada por un déficit en el control sanitario y limpieza de las instalaciones, altas densidades de la población y condiciones de estrés debido al cultivo intensivo que pueden favorecer el desarrollo de la enfermedad (Kusuda *et al.*, 1991).

Además, podemos mencionar que la temperatura, la deficiencia de oxígeno y la excesiva cantidad de amonio, son los principales factores asociados al desarrollo de la infección. Debido a ello, la lactococosis es considerada una enfermedad estacional, desarrollándose principalmente cuando la temperatura del agua asciende por encima de los 15 °C (Ghittino y Múzquiz, 1998).

Se ha confirmado también que la infección en las piscifactorías se manifiesta principalmente por la introducción de animales nuevos, que en ocasiones son portadores asintomáticos y que representan a su vez la fuente de infección a la explotación. Así mismo, la presencia de materia orgánica, sedimento y otros residuos en el agua se han asociado con el desarrollo del agente patógeno (Kusuda *et al.*, 1991).

La transmisión de la enfermedad se lleva a cabo de modo horizontal por vía oral, donde los peces eliminan las bacterias por las heces, infectando de esta manera al resto de animales sanos. Si estos peces enfermos logran recuperarse de un episodio de infección pueden seguir excretando la bacteria por un determinado tiempo, desarrollando de nuevo la enfermedad, cuando las condiciones medioambientales resulten óptimas para *L. garvieae* (Múzquiz *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2002).

De igual manera, se ha descrito que la bacteria puede ingresar en los peces a través de las branquias o abrasiones externas y manifestar la enfermedad. En estos últimos casos, la bacteria puede resistir mejor las condiciones ácidas del estómago al estar protegida por los componentes fecales o del pienso, y al llegar al intestino, puede multiplicarse más activamente estableciendo una infección sistémica. Una vez que la

bacteria pasa a la sangre origina una septicemia de evolución hiperaguda (Romalde *et al.*, 1996).

Por ello, la presencia de *L. garvieae* es una de las principales preocupaciones para muchas granjas que se dedican al cultivo de trucha arcoíris. Además, *L. garvieae* ha sido considerado en los últimos años un agente zoonótico importante (Gibello *et al.*, 2016; Meyburgh *et al.*, 2017), razón por la que aumenta la preocupación en el control de esta enfermedad bacteriana.

Este agente patógeno fue identificado por primera vez en la década de los años 50 en el Reino Unido, asociado a un caso de mastitis bovina (Garvie *et al.*, 1981). Al inicio fue clasificado como un *Streptococcus*, al que se le dio el nombre de *Streptococcus garvieae* (Collins *et al.*, 1983). Se consideró también que *L. garvieae* causó pérdidas económicas en granjas de cultivo de seriola (*Seriola quinqueradiata*) en Japón en esta misma década (Kusuda *et al.*, 1991). *L. garvieae* fue aislado por primera vez en España en 1988 en una piscifactoría dedicada principalmente al cultivo de trucha arcoíris. Posteriormente se presentaron brotes con la misma sintomatología en piscifactorías de Francia e Italia (Palacios *et al.*, 1993).

Antes de la década de los 90, la especie de *L. garvieae* no fue reconocida como tal, se produjo un error taxonómico y esta vez fue identificada bajo el nombre de *Enterococcus seriolicida*. A finales de la década de los 80 e inicio de la década de los 90, se presentan nuevos brotes en truchas arcoíris en piscifactorías de España, con el mismo cuadro clínico de hiperpigmentación, exoftalmia y hemorragias oculares, que ya había sido observado en ocasiones anteriores. Al mismo tiempo se presentó en piscifactorías de Japón en cultivos de seriola, tal como había ocurrido en el año 1958 (Kusuda *et al.*, 1991; Palacios *et al.*, 1993).

Al observar esta similitud de cuadro clínico, en diferentes especies y en distintas localidades, se realizan nuevos estudios bioquímicos que permitieran confirmar el agente patógeno, por lo que se decidió tomar muestras de órganos de truchas enfermas de las piscifactorías españolas, que presentaban estas manifestaciones clínicas y se compararon con cepas de *L. garvieae* identificadas en la década de los 50 y clasificadas con el nombre de *Streptococcus garvieae* y cepas de *Enterococcus seriolicida*. A nivel fenotípico, los resultados reflejaron que existía similitud en ambas

especies, de la misma manera el análisis de proteínas de membrana y de secuenciación del 16S ARN ribosomal determinó homología idéntica entre *S. garvieae* y *E. seriolicida*. En este momento se confirma que *E. seriolicida* es la misma especie que *S. garvieae* (Doménech *et al.*, 1993).

Tras estudios morfológicos y bioquímicos realizados sobre la clasificación de esta bacteria, se logró determinar en 1985 la clasificación del género *Streptococcus*, y se reclasifica de *Streptococcus garvieae* a *Lactococcus garvieae* (Schleifer *et al.*, 1985; Doménech *et al.*, 1993; Eldar *et al.*, 1996; Teixeira *et al.*, 1996).

Finalmente se concluye que su clasificación taxonómica, la cual se mantiene hasta la fecha de hoy, es la siguiente: dominio Bacteria, división Firmicutes, clase Bacilli, orden *Lactobacillales*, familia *Streptococcaceae*, género *Lactococcus*, especie *garvieae* (Facklam *et al.*, 1995).

La bacteria *L. garvieae* se encuentra en diferentes tipos de ambientes, lo que le permite sobrevivir en condiciones poco favorables. Se presenta principalmente en medios acuáticos, animales terrestres y algunos estudios de investigación mencionan que en los últimos años se ha identificado la presencia de *L. garvieae* en muestras de humanos, por lo que basándose en estos hechos no solo es considerado patógeno de animales, sino también se menciona que produce infecciones en humanos, que muchas veces están relacionadas con el consumo de alimentos o peces infectados por esta bacteria (Ortiz *et al.*, 2014; Malek *et al.*, 2019).

Los principales casos en humanos se han descrito sobre todo en pacientes que presentan endocarditis infecciosas, siendo una de las primeras causas para considerarlo un patógeno zoonótico (Fihman *et al.*, 2006; Vinh *et al.*, 2006; Yiu *et al.*, 2007; Gibello *et al.*, 2016). Así mismo es considerado como un agente oportunista sobre todo en pacientes inmunodeprimidos y de edad avanzada (Russo *et al.*, 2012). También ha sido descrito como principal causante de abscesos hepáticos y procesos septicémicos (Mofredj *et al.*, 2000).

Este agente patógeno tiene la capacidad para desarrollarse en condiciones ambientales y de laboratorio. Además, en el medio ambiente se puede multiplicar fácilmente a temperaturas que oscilan alrededor de 4 °C, tardando de 12 a 15 días en

crecer, mientras que a 45 °C puede observarse crecimiento en 18 horas. Sin embargo, en condiciones de laboratorio, la temperatura óptima para su crecimiento oscila entre 22 °C y 30 °C, presentando un crecimiento a las 24-48 horas (Vendrell *et al.*, 2006).

El aislamiento y cultivo bacteriológico es una de las principales técnicas, mediante las cuales se pueden identificar las características macroscópicas de la bacteria, pero para esto no se utilizan medios de cultivos selectivos sino más bien generales, como agar tripticosa de soja (TSA), agar sangre (AS) o caldo infusión de cerebro y corazón (BHIB). Estos son los medios de cultivos más recomendados, ya que contienen concentración de 6,5% de cloruro de sodio (NaCl) y un pH entre 7-9, condiciones que le permiten a la bacteria tener un mayor desarrollo (Brunt y Austin, 2005).

En estos medios de cultivo generales se pueden visualizar las características morfológicas de las colonias aisladas, que se observan de forma puntiforme, superficie lisa, color blanco, consistencia viscosa, borde entero, convexo, brioso, sin pigmento, con un diámetro que oscila entre 0,5 y 1,5 µm. En el medio de cultivo AS, las colonias producen α hemólisis y al microscopio óptico se observan cocos Gram positivos que se pueden presentar en pares o en cadena cortas (Stiles y Holzapfel, 1997; Klein *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 2000).

Después de confirmar la patogenicidad que presenta esta bacteria a finales de la década de los 80, se empezaron a realizar los primeros estudios que estuvieran relacionados con el factor de virulencia de *L. garvieae*. Algunos autores concluyen en sus resultados que el factor de virulencia depende principalmente de la adaptación del patógeno a la especie hospedadora, también mencionan que otros factores involucrados son la respuesta inmune del huésped y las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo del patógeno (Kawanishi *et al.*, 2006).

De igual manera, otros autores mencionan que la cápsula externa es considerada un factor esencial en la virulencia ya que protege a la bacteria de la fagocitosis permitiendo la adhesión a la célula del hospedador. Gracias a los análisis comparativos entre cepas virulentas de *L. garvieae* (KG-) y no virulenta ATCC 49156 (KG+), se ha observado que las cepas que expresan el antígeno (KG+) en su pared celular, carecen de envoltura externa (no capsuladas) sobre la superficie celular, lo que le impide presentar resistencia a la fagocitosis por parte de los macrófagos, impidiendo la

capacidad de adhesión a las células del huésped, y desarrollar la patología al entrar en contacto con el mismo (Kawanishi *et al.*, 2006; Morita *et al.*, 2011; Miyauchi *et al.*, 2012).

Sin embargo, *L. garvieae* (KG-) desarrolla su virulencia debido principalmente a la presencia de una cápsula externa involucrada en la patogénesis, permitiendo la adhesión y colonización del patógeno al huésped. Todo indica que la capacidad de poseer envoltura externa hace que la bacteria presente una mayor resistencia a la fagocitosis (Kawanishi *et al.*, 2006; Morita *et al.*, 2011; Miyauchi *et al.*, 2012).

Además, una vez presente el agente patógeno causa en los peces signos clínicos tales como anorexia que puede iniciarse de forma parcial hasta generalizarse, de igual manera podemos observar melanosis, se produce un daño en el cerebro y cerebelo provocando letargia demostrado por una natación irregular, exoftalmia bilateral o unilateral con hemorragia ocular, enteritis, y presencia de hemorragias a nivel renal, en la base de las aletas, en la boca y en la lengua. Entre los daños más severos, se pueden presentar necrosis hepática, esplenomegalia siendo este órgano el principal afectado por su gran vascularización, prolapso anal, pericarditis con infiltración de macrófagos y linfocitos, meningitis bacteriana aguda por infiltración de linfocitos y macrófagos. Finalmente se observa septicemia generalizada culminando con la muerte. Cuando la enfermedad ya está avanzada, el daño que causa *L. garvieae* en cultivos de trucha arcoíris es irreversible (Perera *et al.*, 1994; Vendrell *et al.*, 2006; Ozturk y Altinok, 2014; Merbuy *et al.*, 2017).

El control del agente infeccioso *L. garvieae* se ha realizado a través de la terapia con antibióticos y la aplicación de vacunas comerciales o autovacunas, principalmente algunas de ellas denominadas bacterinas que consisten en utilizar la misma cepa bacteriana inactivada mediante tratamientos físicos, químicos, biológicos o una combinación de varios de estos métodos (Ghittino 1999). Asimismo, se han propuesto vacunas en las que se incluyen componentes de su propia membrana celular (Meyburgh *et al.*, 2017).

Por otra parte, además de las vacunas inactivadas, también se han empleado vacunas elaboradas con la bacteria viva, pero modificada genéticamente (Norqvist *et al.*, 1989), y vacunas adyuvantadas mediante aceites minerales compuestos con

distintas titulaciones de células bacterianas (Treves-Brown, 2000; Romalde *et al.*, 2004).

En cuanto a la eficacia de la vacuna para el tratamiento de la lactococosis, se ha confirmado que proporciona una mejor protección al pez cuando se aplican intraperitonealmente. Sin embargo, esta vía de administración supone una manipulación excesiva de los animales que puede causar estrés. También se ha demostrado que la vacunación confiere una protección que no es prolongada en el tiempo, después de la inoculación. De igual manera, podemos mencionar que aumenta el riesgo de que se pierda la viabilidad de las vacunas si no son almacenadas correctamente (Ghittino y Múzquiz, 1998).

Además, existen otros métodos de vacunación que se han empleado en el control de agentes patógenos en cultivos de peces, entre las que destacan las siguientes: técnicas de inmersión en solución vacunal, inyección intramuscular, administración oral, vacunación a través de baño la cual se aplica directamente al agua de cultivo, infiltración anal y el método de aerosol (Heppell y Davis, 2000; Shao, 2001; Klesius *et al.*, 2004).

En este contexto, es necesario la selección de herramientas seguras para la prevención de procesos bacterianos en diferentes especies de producción acuícola y sobre todo en el control de lactococosis que afecta el cultivo de trucha arcoíris.

3.5. Restricción del uso de antibióticos en acuicultura

La producción acuícola es una de las principales actividades económicas más vulnerables a los efectos adversos de los agentes patógenos. En este sentido, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) ha desarrollado un plan de acción global sobre el uso prudente de antimicrobianos con el fin de que éstos se apliquen de manera responsable y que garanticen el desarrollo de la acuicultura bajo condiciones saludables para el medio ambiente y la salud humana.

La legislación europea en la mayoría de sus países establece una nueva normativa sobre el uso de medicamentos veterinarios y pienso medicado con el objetivo de combatir la resistencia antimicrobiana, al igual que promueve un uso prudente y responsable de los antimicrobianos. Esta nueva legislación autoriza para el control de

enfermedades bacterianas en peces los siguientes fármacos antimicrobianos: oxitetraciclina, florfenicol, enrofloxacin, flavomicina, flumequina, ácido oxolínico, sulfadiazina, clortetraciclina, amoxicilina y trimetoprima (LVMP, 2018).

El efecto de los antibióticos depende del mecanismo de acción, la vía de administración y la dosis suministrada, al igual que la especie patógena y la fase de cultivo en la que se encuentra el animal. Se ha confirmado que el uso de antibióticos tiene efectos secundarios en la salud humana y el medio ambiente (Dabrowsky *et al.*, 2004).

El uso masivo de estas terapias antimicrobianas hasta el día de hoy ha desencadenado la aparición de microorganismos resistentes, promoviendo la diseminación de genes de resistencia bacteriana (FAO 2016), demostrando que las bacterias pueden adquirir resistencia a diferentes antibióticos, y provocando de esta manera un problema a nivel mundial (Akinbowale *et al.*, 2007; Heuer *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2012).

En los últimos años muchos países que se dedican a la producción y exportación de productos acuícolas, incluyendo los países de la Unión Europea, reconocen los riesgos asociados al uso de antibióticos y el control estricto que se debe tener sobre la aplicación de los mismos en enfermedades bacterianas.

Otro aspecto que se debe considerar es la eliminación correcta de los residuos de antibióticos presentes en las aguas de las piscifactorías, una vez que éstos han sido utilizados en el control de enfermedades bacterianas, para evitar la diseminación de estos residuos a otras especies de animales que se alimentan alrededor de las granjas (Heuer *et al.*, 2009; Allen, 2014).

Esta problemática es lo que ha llevado a muchos países a modificar el uso de antibióticos, involucrándose en esta lucha organismos tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), FAO, OIE, al igual que la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Estas organizaciones han acordado la importancia de limitar el uso de antibióticos en todos los sectores de la producción de animales para consumo humano, entre los que se encuentra el sector acuícola, obligando a buscar métodos

alternativos seguros para la salud humana y respetuosos con el medioambiente (FAO, 2005; EFSA, 2012; OIE, 2015).

La preocupación por el uso excesivo de antimicrobianos utilizados en el sector acuícola ha aumentado hasta establecer límites máximos de residuos (LMR) de aquellas sustancias que ocasionen daños en la salud pública. Los principales países que encabezan esta lucha son pertenecientes a la Unión Europea, entre los que destacan España y Noruega. De igual manera en el continente americano han iniciado esta lucha países como Estados Unidos y Canadá (WHO, 2015; FAO, 2016).

Debido a las consecuencias que conlleva el uso masivo de los antibióticos, las organizaciones competentes han acordado establecer una lista limitada de estos fármacos que puede suministrarse en casos muy extremos, especificando las especies a las que están destinadas, sus dosis, duración del tratamiento, el periodo de supresión que debe respetarse antes del sacrificio y las dosis residuales permitidas en el tejido del animal. También se señala que en granjas en las que han utilizado dosis excesivas de estos fármacos se ha determinado su total prohibición con el objetivo de minimizar el riesgo de que las bacterias patógenas desarrollen resistencias o transfieran genes de resistencias (WHO, 2015; FAO, 2016).

Sin embargo, la incidencia y prevalencia de las enfermedades infecciosas siguen siendo de las principales preocupaciones en el sector acuícola. Por ello, es necesario establecer o desarrollar nuevos métodos alternativos que no sólo resulten eficaces para el control de estas enfermedades, sino también que sean económicos, seguros para la salud humana y sobre todo respetuosos con el medio ambiente.

3.6. Fitobióticos

Conscientes de la importancia de la búsqueda de nuevas alternativas a los compuestos quimioterapéuticos, consideramos que el uso de fitobióticos puede ser una herramienta para prevenir las enfermedades bacterianas en cultivos de trucha arcoíris.

El término fitobiótico o fitogénico es reciente, puesto que no es hasta inicio del siglo XXI, que se define como un compuesto derivado de plantas con propiedades

biológicas activas, que pueden ser añadidos a la dieta de los animales como suplemento seguro sintetizado de manera natural (Hazzit *et al.*, 2006).

En los últimos años el uso de extractos de plantas ha demostrado ser una alternativa a los antibióticos. Los compuestos elaborados, bien sean a partir de plantas o extractos de éstas, han demostrado ser potenciales agentes antimicrobianos, antioxidantes (Brenes y Roura 2010) y algunas plantas poseen la capacidad de bloquear la transcripción de ciertos virus (Bakkali *et al.*, 2008).

Existe interés de diferentes investigadores por conocer más acerca de los efectos beneficiosos de estos compuestos. Por ello, estudios recientes están enfocando sus líneas de investigación en el uso de estas alternativas para evaluar su actividad antimicrobiana frente a diversos patógenos que afectan principalmente a los cultivos acuícolas (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018).

Aunque ciertos tipos de plantas son utilizados actualmente como recurso terapéutico natural, el uso fue puesto en práctica aproximadamente hace 2.000 años. La utilización de estos extractos ha obtenido buenos resultados, lo que ha mejorado su uso a lo largo de los años, pudiendo ser ofrecido como herramienta terapéutica (Burt, 2004). A los fitobióticos se les ha atribuido resultados positivos, incrementando el peso en los animales cuando son utilizados como suplemento alimenticio o bien mejorando la salud en organismos acuáticos (Abdel *et al.*, 2017). Un estudio demostró que la administración de un fitobiótico comercial que contiene orégano, anís y aceites cítricos incrementaron la tasa de supervivencia de trucha arcoíris frente a *A. salmonicida* (Menanteau-Ledouble *et al.*, 2015). De igual manera otro estudio demostró que la administración de un extracto acuoso de neem (*Azadirachta indica*) y orégano (*Lippia berlandieri*) en el cultivo de postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) mejoró la salud de éstas frente a *Vibrio parahaemolyticus* (Morales-Covarrubia *et al.*, 2016). Así mismo se atribuyen a los fitobióticos otros usos como desinfectante, o en el control de agentes patógenos en el agua de los tanques de cultivo acuícola (Morales-Covarrubias *et al.*, 2016).

3.6.1. Ventajas del uso de los fitobióticos

Algunos estudios han hecho que los fitobióticos sean considerados como una alternativa segura que puede actuar sobre los microorganismos, inhibiendo la presencia de bacterias patógenas. El uso de fitobióticos puede proporcionar algunas ventajas, porque son compuestos biodegradables, biocompatibles y seguros para el hospedador y el medio ambiente, así como para la salud humana.

Todo indica que la aplicación de productos procedentes de plantas utilizados en el control de enfermedades en acuicultura contribuye al fortalecimiento del sistema inmunitario, permitiendo a los animales poseer mayor resistencia frente a infecciones provocadas por agentes patógenos (Robertsen, 1999; Kareem *et al.*, 2016; Pérez-Sánchez *et al.*, 2018).

Los resultados prometedores obtenidos del uso de extractos de plantas en el control de infecciones bacterianas en peces han demostrado ser uno de los enfoques de la industria acuícola para su futuro desarrollo, fundamentalmente por su bajo costo. Entre ellos, podemos destacar que el uso de fitobióticos mejora la tasa de crecimiento, estimula la ingesta de alimentos, mejora el balance de la microbiota intestinal y posee propiedades antimicrobianas frente a ciertos patógenos (Mitsch *et al.*, 2004; Hazzit *et al.*, 2006; Muthusamy y Sankar, 2015; Yitbarek, 2015).

La dieta con fitobióticos también ha demostrado producir un incremento de peso, principalmente porque provocan un retraso en el vaciado gástrico, disminuye la motilidad intestinal debido a la relajación del músculo liso del intestino delgado, permitiendo el paso lento de los alimentos y reduciendo de esta manera los riesgos de diarreas causadas por material no digerido (Wilfart *et al.*, 2007). Además, la dieta con fitobióticos permite un efecto estimulador de las secreciones digestivas, tales como enzimas digestivas, bilis y moco (Platel y Srinivasan, 2004).

Algunos estudios han sugerido que los extractos de plantas pueden aumentar las inmunoglobulinas en el tracto intestinal, así como también producir el retraso de la liberación del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), hormona insulínica intestinal que está involucrada en la estimulación del apetito y la absorción de la glucosa, permitiendo que el tracto digestivo tenga las condiciones óptimas para la

absorción de nutrientes, además de reducir las enfermedades digestivas causadas por el estrés (Yang *et al.*, 1998).

La actividad antimicrobiana de los fitobióticos no es atribuible a un compuesto específico sino a varios presentes en las plantas (Carson *et al.*, 2002), entre los que se encuentran los compuestos fenólicos, carvacrol, eugenol, timol, linalol, terpenoides, alcaloides, metilo, cinamato, alcanfor, lectina, aldehídos, cetonas, polipéptidos y poliácetilenos (Citarasu *et al.*, 2002; Sivaram *et al.*, 2004; Adebolu *et al.*, 2005). También algunos de ellos poseen ácido carboxílico por lo que se puede atribuir un efecto antiinflamatorio (Azemi *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2016).

3.6.2. Desventajas del uso de los fitobióticos

A pesar de los resultados prometedores sobre el uso de fitobióticos, lamentablemente se han determinado algunas limitaciones en su utilización, entre las que se encuentran la composición de las plantas, que puede variar considerablemente según la región geográfica, las propiedades del suelo, la temperatura a la que ha sido cultivada, así como la variedad y el método de extracción de los compuestos de la planta (Runyoro *et al.*, 2010).

Otra desventaja muy importante que se debe tener presente es que ciertas plantas tienen efecto tóxico sobre la salud de los peces y sobre el medioambiente, como es el caso de las que presentan compuestos etanólicos, cloroformo, n-butanol y componentes antagonistas de calcio como el metanol (Ali *et al.*, 2011; Mabhiza *et al.*, 2016).

Los fitobióticos no excluyen los efectos adversos para la salud del animal entre los que comúnmente pueden causar dermatitis alérgica por contacto e irritación de la mucosa gástrica por ingesta (Burt, 2004). De igual manera para el consumidor pueden contener residuos no deseados del producto al momento de ingerirlos (Baba *et al.*, 2005; Stoni *et al.*, 2006). Se ha demostrado también que la acción que ejercen los fitobióticos incluyen sustancias no deseadas o tóxicas, por lo tanto, son necesarios estudios que determinen el mecanismo de acción de cada uno de estos compuestos, lo que se convierte en un desafío.

3.7. Probióticos

La administración de cepas probióticas es considerada por muchos investigadores como una alternativa de control biológico adecuada demostrando eficacia para ser utilizada ante infecciones bacterianas frecuentes en las piscifactorías. Los probióticos pueden desarrollar efectos beneficiosos en la producción y se pueden utilizar como una herramienta para reducir la aplicación de antibióticos (Pérez-Sánchez *et al.*, 2010; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014; Border *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2017).

La FAO y la OMS acuerdan definir el término probiótico como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren efectos saludables en el huésped (FAO/WHO, 2001).

Las principales cepas probióticas utilizadas en el cultivo acuícola con fines preventivos y terapéuticos son las bacterias Gram positivas, particularmente las bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* y *Carnobacterium*, siendo una de las principales características para su elección que no sean patógenas, además de ser antagonica frente a una o más cepas patógenas (Merrifield *et al.*, 2010).

Las bacterias ácido lácticas son un grupo heterogéneo de microorganismos capaces de producir ácido láctico por medio de la fermentación de azúcares a partir de la glucosa, manosa, galactosa o fructosa. Son oxidasa, catalasa y bencidina negativas, anaerobias facultativas o aerotolerantes, no móviles, no esporulados, carecen de citocromo, no reducen el nitrato a nitrito (excepto algunas anaerobias estrictas), acidófilas o acidotolerantes con un pH óptimo entre 4 y 4,5 (Liu *et al.*, 2010).

Otra especie de bacterias ácido lácticas utilizadas no solo en acuicultura, sino también en humanos, es *Lactobacillus rhamnosus*. Esta bacteria confiere un efecto protector frente a infecciones causadas por *A. salmonicida* y *Edwardsiella tarda*, entre otros agentes patógenos, presentes en cultivos de trucha arcoíris y tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Nikoskelainen *et al.*, 2001; Pirarat *et al.*, 2006). Estudios experimentales con *L. rhamnosus* también han demostrado un efecto protector frente a diversas infecciones causadas por microorganismos patógenos difíciles de controlar, entre los que se encuentra *L. garvieae* (Vendrell *et al.*, 2008). Gatesoupe (1991) demostró el efecto beneficioso de algunas bacterias del género *Lactobacillus* (*L.*

plantarum y *L. helveticus*) en rodaballos (*Scophthalmus maximus*), tras observar un incremento significativo en los índices de crecimiento.

Jöborn *et al.*, (1997) determinaron que *Carnobacterium inhibens*, aislado del tracto gastrointestinal del salmón atlántico (*Salmo salar*), era capaz de producir sustancias inhibitorias *in vitro* frente a varios agentes patógenos. Al realizar los estudios *in vivo* se observó que se trataba de una cepa metabólicamente activa, tanto en la mucosa intestinal como en las heces de los salmónidos.

Cepas del género *Bacillus* también han sido ampliamente utilizadas como probióticos (Balcázar *et al.*, 2006). Especies de este género se caracterizan por producir endosporas cuando las condiciones ambientales son adversas. Además, la mayoría de las especies no son patógenas para el ser humano ni para los animales, lo que facilita la utilización de los metabolitos que producen, entre los que se incluyen principalmente enzimas (Moriarty 1998). Se ha comprobado el efecto beneficioso de algunas cepas de la especie *Bacillus pumilus*, al tener un efecto antagónico contra *Pseudomonas fluorescens* y *Streptococcus iniae* en tilapias (*O. niloticus*) (Aly *et al.*, 2008).

Entre las principales bacterias Gram negativas utilizadas como probióticos en cultivos acuícolas se encuentran: *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Vibrio* (Nayak, 2010). Garriques y Arevalo (1995) sugirieron que los efectos beneficiosos de algunas cepas de la especie *Vibrio alginolyticus* eran provocados principalmente por la acción de mecanismos de exclusión competitiva frente a la cepa patógena. Gibson *et al.*, (1998) observaron que *Aeromonas media* reducía la proliferación de *Vibrio tubiashii* en larvas de ostras del Pacífico (*Crassostrea gigas*). El efecto antagonista de *Pseudomonas* se ha demostrado al inhibir el crecimiento de algunas bacterias patógenas para crustáceos de la familia *Penaeidae* como *Vibrio harveyi*, *Vibrio fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Photobacterium damsela* por medio de inhibidores de bajo peso molecular (Chythanya *et al.*, 2002). Austin *et al.*, (1995) demostraron el papel protector de *V. alginolyticus* en el salmón del Atlántico frente a infecciones causadas por *A. salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Vibrio ordalii*.

3.7.1. Mecanismos de acción de los probióticos

Los probióticos pueden cumplir con la función de reforzar y reparar la barrera intestinal dañada por el paso de bacterias patógenas, contribuyendo así a la permeabilidad de la mucosa intestinal y al equilibrio ecológico bacteriano. Durante las infecciones bacterianas actúan como inhibidores de la adhesión o bloqueando la penetración de los patógenos a la mucosa intestinal (Lee *et al.*, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2003; Pérez- Sánchez *et al.*, 2011).

Además, tienen la capacidad de ser productores de sustancias antimicrobianas como el ácido láctico, el peróxido de hidrógeno, el diacetilo y las bacteriocinas, los cuales inhiben la colonización de agentes infecciosos, así como también disminuyen el pH intestinal, favoreciendo el aumento de la producción de microorganismos benéficos en la microbiota intestinal y, por consiguiente, logrando que éstos compitan frente a diferentes patógenos (Isolauri *et al.*, 2001; Balcázar *et al.*, 2006).

Las cepas probióticas también tienen la capacidad de colonizar los sitios de adhesión de la superficie del epitelio gastrointestinal para competir por nutrientes con los patógenos, estimular la inmunidad innata y adquirida, al igual que aumentar la producción de inmunoglobulina A (IgA), activando los macrófagos e incrementando la concentración de interferón (IFN) gamma (Madsen *et al.*, 2001; Collado *et al.*, 2007; Balcázar *et al.*, 2007).

3.7.2. Ventajas del uso de probióticos

Existen muchas investigaciones en peces que demuestran los efectos beneficiosos de la administración de probióticos, entre los que se puede mencionar el estudio realizado por Adel *et al.*, (2017), donde observaron que la administración de dos especies de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y *S. elipsoedas* en trucha arcoíris durante ocho semanas, aumentó su tasa de crecimiento, el nivel de proteína total y la actividad de la lisozima en el mucus de la piel, e incluso se observó un aumento en la población de bacterias ácido lácticas en la microbiota intestinal de todos los grupos alimentados con esta dieta probiótica. El potencial inhibidor del mucus cutáneo contra los patógenos de los peces se incrementó significativamente, al igual que los parámetros inmunitarios humorales y celulares. Así mismo, mejoró las actividades de

las enzimas intestinales, obteniendo un mayor crecimiento. Castro *et al.*, (2017) también demostraron que, después de una alimentación por treinta días en truchas arcoíris con una dieta probiótica de levadura *S. cerevisiae*, los peces desarrollaron un alto potencial inmunoestimulador y un mayor crecimiento.

El uso de probióticos ha ganado aceptación en la acuicultura para mantener la calidad del agua y aumentar el crecimiento de los organismos. En un estudio realizado por Melgar *et al.*, 2013, en el cultivo intensivo de camarón blanco, se analizó el efecto de una mezcla comercial de microorganismos tales como: *Rhodopseudomonas palustris*, *Lactobacillus casei*, *L. plantarum* y *S. cerevisiae*, sobre la calidad del agua, el sedimento presente en el fondo de los estanques y el crecimiento del animal. Los resultados obtenidos por estos investigadores, después de alimentar a los animales durante aproximadamente tres meses, demostraron el efecto beneficioso del uso de la mezcla probiótica comercial en los parámetros ambientales y de crecimiento en el cultivo de camarón blanco, así como un menor tiempo de cosecha en los animales tratados con la dieta probiótica. De igual manera, los valores de pH se mantuvieron estables en el agua de cultivo de los grupos tratados, reduciendo las concentraciones de nitrato, promoviendo una mayor eliminación de materia orgánica y una mayor tasa de supervivencia.

En un trabajo realizado por Pérez-Sánchez *et al.* (2011) después de alimentar durante 21 días a truchas arcoíris con una dieta suplementada con *L. plantarum*, se observó una disminución en su tasa de mortalidad tras un desafío frente al patógeno *L. garvieae*. Los resultados del análisis molecular evidenciaron que los peces a los que se les administró la dieta con el probiótico habían potenciado su producción de IL-1 β y TNF- α en comparación con el grupo control, demostrando que los peces alimentados con probióticos desarrollaron mayor protección frente a *L. garvieae* a través de la modulación de la respuesta inmune.

3.7.3. Desventajas del uso de probióticos

Los beneficios esperados de las cepas probióticas utilizadas hasta la fecha en acuicultura son variables, ya que su éxito depende de la susceptibilidad de la especie, el estado del cultivo, el tipo de instalaciones y el sistema de cultivo, el tiempo de

supervivencia o permanencia de los microorganismos en el agua antes de ser consumido por los animales, considerando que estas condiciones podrían no ser idóneas para los probióticos.

Asimismo, se debe tener en cuenta que una de sus principales desventajas es que los probióticos no están exentos de adquirir genes de resistencia a los antibióticos, provocados por el efecto a largo plazo de agregar un alto número de bacterias vivas a los sistemas acuícolas y transferírseles a otras especies de bacterias (Watts *et al.*, 2017).

Por otra parte, se debe tener en cuenta la selección correcta de la cepa probiótica, asegurándose que el microorganismo utilizado no afecte a los organismos acuáticos, como fue el caso de un estudio en *Penaeus monodon* en el que se administró la cepa probiótica *Bacillus subtilis* causando en la especie cultivada sintomatología similar a la del síndrome de la mancha blanca (Wang *et al.*, 2000).

A pesar de haber demostrado efectos beneficiosos, la utilización de dietas probióticas, como medida de control preventiva frente a diversos agentes patógenos en cultivos acuícolas, no se pueden excluir los posibles efectos adversos derivados de la inclusión de bacterias probióticas. Por lo tanto, se requiere de más estudios que determinen si realmente es segura para su uso extendido en producción.

3.8. Postbiótico

El término postbiótico fue definido por primera vez en el 2010, y hace referencia a suplementos metabólicos generados por un microorganismo probiótico, en la etapa final o intermedia del metabolismo, influyendo de manera beneficiosa en el huésped (Thomas y Greer, 2010).

Años más tarde, Aguilar-Toalá y colaboradores reafirman que los postbióticos son productos microbianos producidos por cepas probióticas o metabolitos biogénicos, o simplemente se pueden llamar sobrenadantes libres de las células secretadas de las bacterias probióticas como consecuencia de la lisis bacteriana (Aguilar-Toalá *et al.*, 2018). También se le ha dado el término de terapia de interferencia microbiana (MIT), por sus siglas en inglés *Microbial Interference Therapy* (Falagas *et al.*, 2008).

3.8.1. Mecanismos de acción de los postbióticos sobre el huésped

Algunos estudios sugieren que el uso de postbióticos como suplemento mejora el crecimiento y la salud debido a la acción benéfica que éstos ejercen sobre el estado inmune del huésped, además de mejorar la integridad de la microbiota intestinal, reducir el valor del pH, inhibiendo así la adhesión de los patógenos a la mucosa intestinal del animal (Thanh *et al.*, 2010; Cicienia *et al.*, 2014; Kareem *et al.*, 2017).

La función principal de los postbióticos es aumentar la eficacia de los microorganismos activos presentes en la microbiota intestinal. Dentro de estos subproductos se encuentran: ácidos grasos de cadena corta, enzimas, péptidos, ácido teicoico, muropéptidos derivados de peptidoglicano, polisacáridos, proteínas de la superficie celular, ácidos orgánicos, vitaminas, receptores de superficie celular y plasmológenos (Thanh *et al.*, 2009; Tsilingiri *et al.*, 2012; Cicienia *et al.*, 2016).

3.8.2. Propiedades terapéuticas de los postbióticos

Los postbióticos poseen diferentes propiedades terapéuticas entre las que destaca la actividad antimicrobiana, la cual se debe fundamentalmente a la presencia de bacteriocinas y ácidos orgánicos (ácido láctico y peróxido de hidrógeno), provocando la reducción del valor del pH intraluminal, principal mecanismo de inhibición de las cepas patógenas, confiriendo efecto protector sobre la barrera del intestino (Aguilar-Toalá *et al.*, 2018).

En el efecto inmunomodulador se observa el aumento de los niveles de la inmunoglobulina A (IgA) intestinal en la lámina propia del intestino delgado y grueso, disminuyendo el daño causado por los agentes patógenos (Dunand *et al.*, 2019).

De igual manera se ha confirmado su efecto antiinflamatorio, debido a la capacidad que tienen de activar el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB) (Cicienia *et al.*, 2014).

Actualmente los resultados obtenidos con el uso de postbióticos demuestran ser beneficiosos y prometedores, indicando que podría ser una alternativa para el control y prevención de las enfermedades bacterianas. Así mismo, se ha demostrado que no causan daños en el huésped, ni en la salud humana y son respetuosos con el medio

ambiente, siendo esta una opción ideal para ser utilizada en el futuro de manera segura para el control de infecciones bacterianas en acuicultura.

Se ha demostrado también que la combinación de dos o más metabolitos postbióticos procedentes de diferentes especies de cepas probióticas tiene mejor efecto en la respuesta inmune frente a los agentes patógenos que si sólo se utilizara uno (Loh *et al.*, 2010; Thu *et al.*, 2011; Choe *et al.*, 2013).

Los principales beneficios de su uso son el aumento de la permeabilidad de la mucosa intestinal, se promueve el crecimiento de las células epiteliales intestinales, o el efecto antiproliferativo y antioxidante (Aguilar-Toalá *et al.*, 2018).

Con el uso de postbióticos se elimina el riesgo que implica la administración de microorganismos vivos (cepas probióticas), que puede causar efectos adversos en la salud del huésped, como la transferencia de genes de resistencia a los antibióticos (Marteau *et al.*, 2003; Egervärn *et al.*, 2009; Shazali *et al.*, 2014).

3.8.3. Postbióticos en diferentes especies de animales

El uso de postbióticos, a pesar de ser una alternativa reciente, ha demostrado un efecto beneficioso, como es el caso de un estudio realizado en aves en el cual pollitos de la subespecie *Gallus gallus domesticus* fueron asignados a seis grupos de tratamiento. Los resultados mostraron que, tras un período de seis semanas, las aves alimentadas con una dieta postbiótica con inulina presentaron una mayor ganancia de peso y una mejor respuesta inmune (Kareem *et al.*, 2017). Además, este estudio demostró que la combinación entre el postbiótico y la inulina pueden reemplazar el uso de antibióticos que son frecuentemente utilizados como promotores del crecimiento en la industria avícola.

De igual manera podemos mencionar otro estudio en aves en el que se utilizaron pollos de engorde que fueron alimentados con dieta postbiótica a partir de una combinación de metabolitos procedentes de cepas de *L. plantarum* durante 12 semanas. Los resultados mostraron un mayor crecimiento de los animales (Loh *et al.*, 2014).

En un estudio realizado en lechones de cuatro semanas se administró una dieta postbiótica obtenida de una cepa de *L. plantarum*. Los resultados mostraron que dicha dieta provocó un aumento en la tasa de crecimiento, reducción del índice de conversión de alimento, aumento de la cantidad y diversidad de la microbiota intestinal beneficiosa y se observó una regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta temprana a enfermedades. Los autores también observaron que la incidencia de diarrea se redujo cuando los lechones se alimentaron con esta dieta, sugiriendo que su administración podría mejorar la microbiota intestinal y la salud de los lechones (Thu *et al.*, 2011).

Los estudios realizados en peces donde se ha evaluado el uso de postbióticos son pocos; sin embargo, un estudio realizado en lubinas juveniles (*Dicentrarchus labrax*) en las cuales se administró una dieta postbiótica obtenida de la levadura *S. cerevisiae*, se observó una reducción del índice de conversión de alimento, una mayor tasa de supervivencia y una carga bacteriana intestinal beneficiosa presente en los peces alimentados con la dieta postbiótica tras un período de 12 semanas (Goda *et al.*, 2018).

En los últimos años, se han buscado nuevas alternativas al control de las enfermedades bacterianas entre las que se encuentran el uso de paraprobióticos, el cual se describe como células microbianas probióticas inactivas o fracciones de células que pueden proporcionar beneficios al huésped (Taverniti y Guglielmetti 2011). Su aplicación en la acuicultura se encuentra en una etapa inicial, pero con los pocos resultados obtenidos hasta la fecha se presenta como una alternativa potencial para mejorar la salud y el bienestar de los animales. Tal es el caso de un estudio realizado por Wu *et al.* (2020) en esturión híbrido (*Acipenser baerii* x *Acipenser schrenckii*) durante tres semanas de administración de una dieta paraprobiótica y posbiótica (Herpes Worry Free o HWF™) a 30 peces, cuyo objetivo fue evaluar el efecto del suplemento y la expresión de genes promotores de crecimiento en un primer experimento. En un segundo experimento al finalizar el tiempo destinado para alimentar a los esturiones con HWF™, el contenido intestinal de los esturiones fue transferido a un cultivo de pez cebra (*Danio rerio*) para colonizar su intestino y de esta manera evaluar la expresión de genes promotores de crecimiento y genes reguladores

inmunes de esta especie. Los resultados reflejaron que la microbiota intestinal de los esturiones mejoró, mostraron ganancia de peso significativamente mayor y una tasa de conversión alimenticia más baja en comparación con el grupo control. El análisis de secuenciación reflejó una abundancia relativa del filo *Firmicutes* en los peces de estudio. La expresión de genes relacionados con el crecimiento, la inflamación y la inmunidad no específica se incrementó significativamente en el pez cebra colonizado con la microbiota intestinal del grupo de esturión alimentado con HWF™. Sin embargo, varios aspectos relacionados con los beneficios que ofrecen los paraprobóticos permanecen aún sin explorar.

3.8.4. Postbióticos como una alternativa segura

En los últimos años, las enfermedades infecciosas se han convertido en factor limitante para el desarrollo y la intensificación de la actividad acuícola, obligando a la búsqueda de herramientas seguras para la prevención de estas enfermedades.

Varios estudios sugieren que el beneficio que ofrecen los probióticos podría ser considerados como una buena alternativa, pero por ser microorganismos vivos provocan cierta preocupación debido a la posibilidad de transferir genes de resistencias a otras bacterias. Sin embargo, el beneficio proporcionado a la microbiota intestinal, la protección contra los patógenos y la contribución al desarrollo y estimulación de la respuesta inmune en los animales (Pérez *et al.*, 2010), nos motiva a buscar una estrategia que permita obtener los beneficios que ofrecen estos compuestos, sin correr el riesgo de administrar microorganismos vivos.

Existe evidencia que los beneficios proporcionados por los probióticos se dan gracias a la capacidad de llegar vivos al intestino y colonizar. Sin embargo, los efectos beneficiosos observados en el hospedador no necesariamente tienen que estar mediados por la presencia de microorganismos vivos, sino por las moléculas que son secretadas por el metabolismo de ellos, lo que Aguilar *et al.* (2018) describen como productos microbianos o metabolitos biogénicos.

A pesar de que son pocos los estudios que se tienen sobre el uso de postbióticos en el control de enfermedades bacterianas, las investigaciones realizadas en especies de interés acuícola han demostrado resultados prometedores (Ang *et al.*, 2020). De la

misma forma, la preparación de dietas que incorporan postbióticos parece ser una alternativa más segura que la administración de microorganismos vivos, siempre y cuando el efecto beneficioso observado en el hospedador se mantenga.

Los postbióticos son una alternativa que todavía no ha sido bien explorada sobre todo en especies de salmónidos. Aunque los postbióticos han sido aplicados para el control de otros agentes patógenos y en diferentes especies de animales, hasta el día de hoy no se ha obtenido información sobre la administración de postbióticos para la prevención de la lactococosis, principalmente en trucha arcoíris, lo que como grupo de investigación nos obligó a indagar sobre el beneficio que puede provocar esta inclusión frente a esta enfermedad en el cultivo de la trucha arcoíris. Los resultados obtenidos demostraron que la administración de la dieta postbiótica en los peces permitió un mayor grado de protección frente al agente patógeno en estudio, lo que nos indica que la aplicación de postbióticos puede ser una buena herramienta preventiva (Mora-Sánchez *et al.*, 2020; Pérez-Sánchez *et al.*, 2020).

Un aspecto de gran relevancia que hay que considerar sobre el uso de postbióticos es que éstos han demostrado que pueden ser incorporados junto con el pienso y asegurar su viabilidad durante la producción del mismo y mantener el efecto protector frente a ciertos agente infecciosos como *L. garvieae* (Mora-Sánchez *et al.*, 2020; Pérez-Sánchez *et al.*, 2020), lo que indicaría la eficacia que tienen como estrategia de control, incluso incrementando el efecto protector asociado a la vacunación al utilizar ambas herramientas de manera conjunta.

Además, al administrar los postbióticos en el propio alimento podría ser una ayuda para el sector acuícola puesto que se evitaría el estrés que supone la aplicación de ciertas vacunas o bien se podrían combinar los efectos sinérgicos en la modulación de la respuesta inmune, tanto, la de tipo innato como la adaptativa. No obstante, antes de recomendar su aplicación en los cultivos acuícolas, es necesario realizar más estudios con el fin de poder determinar, entre otros, la dosis de incorporación o el tiempo de administración, además de investigar sobre los mecanismos de acción de los postbióticos.

4. Publicaciones

- Pérez-Sánchez T., Mora-Sánchez B., Balcázar J.L. 2018. Biological approaches for disease control in aquaculture: Advantages, limitations and challenges. *Trends in Microbiology* 26, 896–903.
- Mora-Sánchez B., Fuertes H., Balcázar J.L., Pérez-Sánchez T. 2020. Effect of a multi-citrus extract-based feed additive on the survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following challenge with *Lactococcus garvieae*. *Acta Veterinaria Scandinavica* 62, 38.
- Mora-Sánchez B., Balcázar J.L., Pérez-Sánchez T. 2020. Effect of a novel postbiotic containing lactic acid bacteria on the intestinal microbiota and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biotechnology Letters* 42, 1957–1962.
- Pérez-Sánchez T., Mora-Sánchez B., Vargas A., Balcázar J.L. 2020. Changes in intestinal microbiota and disease resistance following dietary postbiotic supplementation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Microbial Pathogenesis* 142, 104060.
- Mora-Sánchez B., Pérez-Sánchez T., Balcázar J.L. 2020. Phylogenetic analysis of intestinal microbiota reveals novel *Mycoplasma* phylotypes in salmonid species. *Microbial Pathogenesis* 145, 104210.

4.1. Artículo de revisión

Pérez-Sánchez T., Mora-Sánchez B., Balcázar J.L. 2018. Biological approaches for disease control in aquaculture: Advantages, limitations and challenges. *Trends in Microbiology* 26, 896–903.

Opinion

Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges

Tania Pérez-Sánchez,¹ Brenda Mora-Sánchez,^{1,2} and José Luis Balcázar^{3,*}

Although aquaculture activity has experienced a great development over the past three decades, infectious diseases have become a limiting factor for further intensification. Because the use of antibiotics has led to the widespread emergence of antibiotic resistance, the search for alternative environmentally friendly approaches is urgently needed. This Opinion paper offers an update on the successes and challenges of biological approaches for bacterial disease prevention and control in aquaculture. Although most of these approaches are still in research and development stages, some of them have shown promising results in field trials. Therefore, a better understanding of the mechanisms of action of these approaches will help to maximise their beneficial properties.

The Importance of Developing and Implementing Biological Control Strategies in Aquaculture Systems

Aquaculture has become an increasingly important food source worldwide. According to the Food and Agriculture Organisation (FAO) of the United Nations, global aquaculture production has grown from 31.1% in 2004 to 44.1% of the total production of 73.8 million tonnes of fish produced in 2014 [1]. However, this growth has been accompanied by the emergence, or re-emergence, of several infectious diseases. Given that aquaculture usually requires large-scale production facilities, high-density animal populations provide ideal conditions for the emergence and spread of infections, thereby causing severe economic losses. Environmental deterioration can also contribute to the prevalence of infections in aquaculture, particularly because diseases result from disturbed pathogen–host–environment interactions (Figure 1). Although antibiotics have been commonly used as prophylactic and therapeutic agents, the selective pressure created by their extensive use in animals and humans has contributed to the selection, persistence, and spread of antibiotic-resistant bacteria [2]. A recent UK government report has estimated that 700 000 people annually are dying due to infections caused by antibiotic-resistant bacteria, and this number may rise to 10 million deaths annually by 2050 if steps are not taken (<http://amr-review.org>). The use of antibiotics in aquaculture depends on local regulations, which may vary widely. In Europe, North America, and Japan, regulations on their use are strict, and only a few substances are licensed [3]. However, developing countries contribute to 90% of the world aquaculture production, with many of them lacking specific regulations [4]. For instance, a recent report from Oceana has shown that antibiotic use in Chilean salmon farming was ~900 g/ton of harvested biomass, whereas 0.17 g/ton was used in Norway (<http://oceana.org>). Vaccination represents an alternative control strategy for infectious diseases; however, its efficacy is often limited or ineffective when applied to juvenile fish because they are not fully immunocompetent. Vaccination is also not feasible for farmed crustaceans and molluscs because they do not possess the capacity to develop long-term

Highlights

Growing global concerns about antibiotic resistance have prompted the search for environmentally friendly approaches for preventing and controlling diseases in aquaculture.

Probiotics, prebiotics, their combination (synbiotics), nonviable bacterial or metabolic byproducts derived from probiotic bacteria (postbiotics), plant-derived natural compounds (phytobiotics), bacteriophages, and quorum sensing interference could be potential alternatives to the use of antibiotics in aquaculture.

Biological approaches used as preventive or therapeutic measures are needed when vaccination is not feasible in juvenile fish or farmed crustaceans and molluscs.

¹Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

²Department of Animal Health, Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVEDI), School of Veterinary Medicine, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León, Carretera a la Ceiba 1 Km al Este, León, Nicaragua

³Catalan Institute for Water Research (ICRA), Scientific and Technological Park of the University of Girona, Emili Grahit 101, 17003 Girona, Spain

*Correspondence: jbalcazar@icra.cat (J.L. Balcázar).

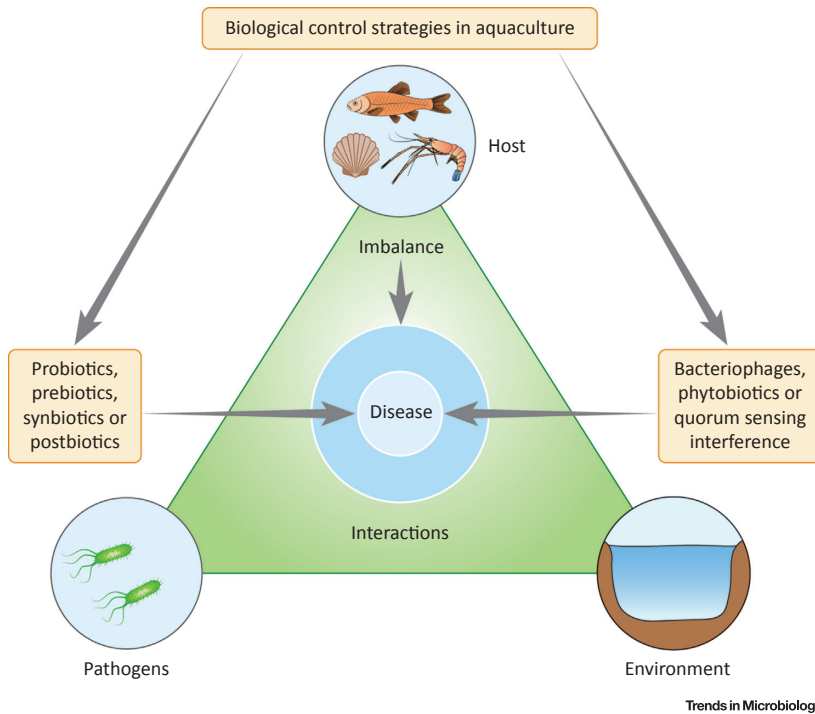


Figure 1. Disturbance of Pathogen–Host–Environment Interactions Leads to Disease. Appropriate strategies should therefore be established to restore a disturbed microbiota to its normal beneficial composition. Applications of probiotics, prebiotics, synbiotics, postbiotics, bacteriophages, or phytobiotics may provide protection by creating a hostile environment for pathogens through several mechanisms, such as production of antimicrobial compounds, competition for available space and nutrients, inhibition of virulence gene expression, disruption of quorum sensing, or immunomodulatory properties. These features make them suitable agents for therapeutic applications in aquaculture. This figure has been adapted from Defoirdt *et al.* [62].

acquired immunity [5]. In addition to the low effectiveness of vaccines in early stages of development, and the lack of a true adaptive immune response in some species, there is a limited number of vaccines with marketing authorisation in aquaculture due to the complicated process before commercialisation. Given this, several biological control strategies have been proposed to promote the health and welfare of farmed species [6,7] (Box 1). In this Opinion paper we provide an update on the successes and challenges of these biological approaches for the prevention and/or control of infectious diseases in aquaculture.

Applications of Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, or Postbiotics

Comparative analyses between animals exposed and unexposed to microorganisms have revealed that the **microbiota** (see Glossary) is substantially involved in a wide range of host functions [8,9]. Evidence obtained from these studies suggests that the intestinal microbiota provides both nutritional benefit and protection against pathogens and contributes to the development and differentiation of immune responses, which has resulted in the promotion of its manipulation through the use of **probiotics** [10]. Based on their mechanisms of action, probiotics can create a hostile environment for pathogens by the production of antimicrobial compounds, competition for available space and nutrients, inhibition of virulence gene

Glossary

Bacteriophages: viruses that infect bacterial cells.

Microbiota: all commensal, symbiotic, and pathogenic microorganisms sharing a defined niche (e.g., intestinal ecosystem).

Phytobiotics: plant-derived natural bioactive compounds which are added to the diet to improve nutrition and health in farm animals and humans [59].

Postbiotics: nonviable bacterial products or metabolic byproducts from probiotic microorganisms that have biological activity in the host [60].

Prebiotics: fermented ingredients that selectively stimulate the growth and/or activity in the gastrointestinal microbiota that confers benefits upon host well being and health [21].

Probiotics: formulations of live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host [61].

Synbiotics: combination of probiotics and prebiotics, which can result in additive or synergistic effects [23].

Box 1. Why Do We Need New Approaches for Disease Prevention and Control In Aquaculture?

Although aquaculture has experienced a remarkable growth and expansion during recent years, infectious diseases are a limiting factor and, in some cases, causing severe economic losses. We therefore need new strategies to prevent and control diseases in aquatic species, especially due to the following issues:

- Limited effectiveness of vaccines in early stages when the immune response is not fully developed.
 - Medicated feed used as a preventive measure could contribute to an increase in antibiotic resistance.
- Several environmentally friendly approaches for preventing and controlling diseases have been proposed; however, there are some obstacles that must be overcome before their potential use, such as:
- Difficulty in performing field trials for products/substances with a promising result under experimental conditions.
 - Limited marketing authorisation in aquaculture.
 - Lack of registered products for different aquatic species.

expression, or disruption of quorum sensing [11]. The antimicrobial effects of probiotics can be related to the production of antibiotics, bacteriocins, fatty acids, hydrogen peroxide, lytic enzymes, or organic acids. In particular, bacteriocins are ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by bacteria that have bactericidal or bacteriostatic effects on closely related bacterial strains [12]. These peptides have a number of properties that make them ideal candidates for disease control, although some studies indicate that bacteriocinogenic bacteria may harbour antibiotic-resistance genes [13].

It has also been suggested that bacteriocins play an important role as signalling peptides, communicating with other bacteria via quorum sensing (a chemical way that bacterial cells use to interact with each other and coordinate certain behaviours, such as biofilm formation), and with cells of the host immune system [14]. Nisin is one of the bacteriocins currently approved as a food preservative in over 80 countries, including the European Union and the USA [15]. A recent study demonstrated that the administration of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* WA2-67 conferred protection against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and nisin Z production played a relevant role in this protection [16].

Likewise, among the beneficial effects attributed to probiotic bacteria, their capacity to interact with the host immune system is now recognised as a key mechanism of action protecting fish and shellfish against infections, and this is supported by an increasing number of *in vitro* and *in vivo* studies [11,17]. Probiotic bacteria can modulate the production of pro- and anti-inflammatory cytokines, which are crucial chemical messengers involved in the regulation, activation, growth, and differentiation of immune cells. For instance, dietary administration of *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* was not only able to upregulate interleukin-8 (IL-8) expression in the intestine, and stimulate the expression of several cytokines in the head kidney of rainbow trout, but was also effective in conferring protection against *Lactococcus garvieae* infection [18]. Dietary administration of *Lactococcus lactis* and *Lb. plantarum* also revealed an upregulation of cytokine gene expression in the intestine of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), as well as an increased resistance to *Streptococcus iniae* infection [19]. Similar results have also been observed in crustaceans, where dietary administration of *Bacillus subtilis* strains resulted in an upregulated expression of immune-related genes and an increased disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [20].

Prebiotic are nondigestible food ingredients that have a beneficial effect through their selective metabolism in the gastrointestinal tract, and which allow specific changes in the composition of the microbiota [21]. Considering that **prebiotics** can promote the colonization and growth of beneficial bacteria, such as probiotics, within the intestinal ecosystem, their use may potentially reduce the number of pathogenic bacteria by competing for the same glycoconjugates on the surface of epithelial cells and improving the production of mucus, short-chain fatty acids, and

cytokines [22]. Among them, mannan-oligosaccharides, fructo-oligosaccharides, short-chain fructo-oligosaccharides, inulin, chitosan oligosaccharide, galacto-oligosaccharides, arabinoxylo-oligosaccharides, and isomalto-oligosaccharides have shown promising results in aquaculture [23]. A recent study demonstrated that dietary administration of low-molecular-weight sodium alginate conferred beneficial effects in tilapia (*Oreochromis niloticus*), such as better growth performance, immune response, and resistance to *Streptococcus agalactiae* [24]. Dietary administration of *Astragalus* polysaccharides and chitoooligosaccharides, alone or combined, also resulted in an increased immune response and disease resistance in juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [25].

Altogether, these studies suggest that probiotics and prebiotics may be an ideal alternative to antibiotics in aquaculture. However, probiotics are not exempt from acquiring antibiotic resistance, and the long-term effect of adding high numbers of live bacteria to aquaculture systems has been questioned because those bacteria may also carry high levels of antibiotic resistance genes [3]. Potential adverse effects of horizontal gene transfer should therefore be taken into consideration. A better understanding of the intestinal microbial community under both homeostasis and disease states will permit the development of rationally designed approaches (such as optimal doses and intake durations). Such knowledge will permit the use of metabolic by-products (**postbiotics**), as well as the development and optimization of synergistic combinations (**synbiotics**) as viable strategies for therapy and prevention (Table 1). In fact, inactivated probiotic preparations or postbiotics appear as an interesting alternative to live probiotics. Dietary administration of four inactivated probiotic strains conferred protection against furunculosis in rainbow trout [26]. A recent study demonstrated that dietary supplementation of heat-killed *Lb. plantarum* and β -glucan had a significant interaction on growth performance, digestibility, and immune response in juvenile red sea bream [27]. Likewise, supplementation with synbiotics has shown promising results on growth performance and

Table 1. Biological Control Strategies with Their Primary Advantages and Limitations

Strategy	Advantages	Limitations	Refs
Probiotics, prebiotics, synbiotics, and postbiotics	Improve growth performance and health	Limited protection with some pathogens	[17–20,22, 24–29,63]
	Initiate and modulate immune responses	Variable synergistic effects	
	Prevent pathogen colonization and infection	Marketing authorisation is complex	
Phage therapy	Target specific, whereby avoiding damage to host microbiota	Potential for transfer of virulence and/or antibiotic-resistance genes	[31–39]
	Phage cocktails can reduce resistance development and be more effective than single phages	Potential for resistance development	
Phytobiotics	Antimicrobial, antiparasitic, anti-inflammatory, and antioxidative activities	Some constituents are unstable, e.g., they are photo- and thermo-labile	[41–44]
	Increase host survival	Interactions with host microbiota are unknown	
Quorum sensing interference	Represses biofilm formation and virulence factor production	Dose–response effects are unknown	[53–55]
	Increase host survival	Practical applications are still in progress	

survival rate. For instance, dietary administration of *Pediococcus acidilactici* and galacto-oligosaccharides was reported to synergistically increase immune response and disease resistance in rainbow trout fingerlings compared to when both were given individually [28]. Similar results were observed in Nile tilapia, when the synbiotic diet containing kefir and low-molecular-weight sodium alginate was administered [29].

Treatment with Bacteriophages

Since their discovery in the early 20th century, **bacteriophages** (phages) were recognised to have great potential for treating bacterial infections, an enthusiasm that was discouraged soon after the discovery of antibiotics [30]. However, the increasing prevalence of antibiotic-resistant bacteria has renewed interest in their use as antimicrobial agents to control pathogens through an environmentally friendly alternative [31]. Phages may be grouped into two categories by their life cycle: lysogenic (temperate) phages and lytic phages. The latter have the ability to rapidly lyse infected bacteria, and the capacity to increase their number during infection, which makes them potential biological control agents [32]. Moreover, phages are typically highly specific for their bacterial targets at the species or strain level, thereby minimising adverse effects on commensal bacteria. These properties offer an advantage for controlling specific pathogens because of their selective elimination without affecting the normal microbiota [33].

Use of *Aeromonas* phages pAh1-C and pAh6-C, either via oral administration or intraperitoneal injection, exerted noticeable protective effects – such as reduced mortality rates – in cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) exposed to *Aeromonas hydrophila* infection, with no side-effects during or after treatment [34]. Similar results were observed when *Aeromonas* phage AS-A was administered to juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*), in which no mortality was observed in those exposed to *Aeromonas salmonicida* infection [35]. Although host specificity of phages can be considered as a disadvantage for phage therapy, this could be overcome by applying cocktails of phages. A comparative study demonstrated that phage cocktails are more efficient than a single phage in controlling the growth of *Vibrio parahaemolyticus* [36]. Likewise, administration of phage cocktails resulted in an increased survival rate in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) larvae exposed to *Vibrio harveyi* infection [37]. Despite their antimicrobial potential, some important concerns remain about the use of phages in aquaculture (Table 1). Bacteria can develop resistance to phages through a variety of mechanisms, including blocking phage adsorption, inhibiting the injection of phage genomes, restriction–modification systems, and abortive infection systems [38]. Temperate phages can also transfer antibiotic resistance and virulence determinants from the phage to the host bacterium, although even obligate lytic phages harbour genes of unknown function that could result in undesired gene transfer [39]. Moreover, a recent study has demonstrated that phages can promote horizontal gene transfer by transformation [40]. These concerns should be taken into account in further studies; therefore, the use of purified phage components (e.g., lysins) could be considered to avoid these possible risks.

The Use of Plant Extracts (Phytobiotics)

Plant extracts, also known as **phytobiotics**, have been relatively recently exploited in aquaculture (Table 1), particularly for their antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidative, and anti-parasitic activities [41–44]. Previous studies have demonstrated that essential oils and their major constituents – such as thymol and carvacrol – are active against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, and *Salmonella* spp. but are less effective against *Pseudomonas* spp. due to the formation of exopolysaccharides that increase resistance to these compounds [45,46]. Although the mechanism of action depends on their chemical composition, most essential oils have a higher bactericidal effect on Gram-positive bacteria

than on Gram-negative bacteria, particularly due to differences in the cell membrane composition [46]. For instance, a study demonstrated that administration of a commercial feed additive containing essential oils (such as carvacrol, thymol, anethole, and limonene) confers protection against *A. salmonicida* infection in rainbow trout [43]. Dietary administration of oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) or neem (*Azadirachta indica*) extracts also showed higher survival rates in white shrimp postlarvae exposed to *Vibrio parahaemolyticus* infection than in the control group [44]. It should be noted that azadirachtin is the main bioactive compound of neem, whereas thymol and carvacrol are the two major compounds in the essential oil obtained from oregano, which are of special interest due to their antioxidant and antimicrobial properties [47]. A recent study also demonstrated that the growth, feed intake, lysozyme, and mean corpuscular haemoglobin content of channel catfish (*Ictalurus punctatus*), reared at a low temperature, were enhanced by the addition of flaxseed oil to the diet compared with the unsupplemented diet [48]. Moreover, a comparative study showed that dietary administration of papaya (*Carica papaya*) extract can significantly promote growth and delay gonadal maturation in both male and female tilapia, while camphor (*Cinnamomum camphora*) extract was the most effective for controlling *Streptococcus agalactiae* infection [49]. Some essential oils and their major constituents have also shown anti-quorum sensing activity. Among them, cinnamaldehyde is one of the most studied essential oil components. For instance, the ability of 3,4-dichloro-cinnamaldehyde to decrease quorum sensing-regulated virulence of *Vibrio* species has been demonstrated using a nematode model [50]. It is well known that several *Vibrio* species are opportunistic pathogens of fish, shrimp, oysters, and other shellfish, whereby these essential oil components may be an interesting biological control strategy for aquaculture.

Quorum Sensing Interference

Quorum sensing (QS) is a mechanism of microbial cell-to-cell communication that regulates gene expression in response to population density to coordinate collective behaviours, such as virulence factor production, biofilm formation, and bioluminescence [51]. QS systems in bacteria have been generally divided into at least three classes: (i) LuxI/LuxR-type QS in Gram-negative bacteria, (ii) oligopeptide-two-component-type QS in Gram-positive bacteria; and (iii) *luxS*-encoded autoinducer 2 (AI-2) QS in both Gram-negative and Gram-positive bacteria [52]. The discovery of such mechanisms has led to identification and characterization of compounds or enzymes that quench QS, called QS interference. Some studies have suggested that QS interference represents a promising therapeutic approach (Table 1), and it could be considered a potential strategy for preventing disease in aquaculture systems [53–55]. In fact, several plants, algae, and bacteria produce compounds that mimic QS signals of many bacteria, interfering with bacterial QS and its controlled activities. Purified limonoids, particularly isolimononic acid and ichangin, have shown the ability to interfere with *V. harveyi* cell–cell signalling and biofilm formation by modulating the expression of the response regulator *luxO* [56]. Interestingly, addition of *Bacillus* sp. NFMI-C – which inactivates *N*-hydroxybutanoyl-L-homoserine lactone – to the rearing water improved survival of giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) larvae when challenged with pathogenic *Vibrio campbellii* [57]. Although QS interference provides a promising alternative to attenuating pathogenicity, bacteria can evolve resistance to QS inhibitors. However, it has been suggested that the chances of developing resistance to QS inhibitors are smaller than those to conventional antibiotics [55,58].

Concluding Remarks

Antibiotic resistance is an increasingly serious threat to global public health that requires action at different levels. Aquaculture activity is not exempt from these threats, as antibiotic agents have been widely used to protect fish and shellfish against diseases. Appropriate strategies should therefore be established to mitigate the emergence and spread of antibiotic resistance.

Outstanding Questions

Are there potential risks associated with the use of these biological control approaches?

What doses of these biological control approaches should be used, and for how long?

How do probiotics and prebiotics work together?

Why do some probiotic strains – even those belonging to the same species – show beneficial effects while others do not?

Can we get similar results with the use of postbiotics versus probiotics if the same strain is applied?

Is it really necessary to give a multi-strain preparation to get the most benefit?

This Opinion paper focuses on alternative biological strategies for sustainable aquaculture production. Probiotics, prebiotics, synbiotics, postbiotics, phytobiotics, bacteriophages, and QS interference may be considered environmentally friendly strategies for preventing and controlling diseases in aquaculture. Although most of these strategies have shown promising results, additional studies, particularly at field scale, are needed to select the most adequate strategy on the basis of its mechanism of action (see Outstanding Questions). A better understanding of how fish and shellfish immune systems generally respond to certain microbiota components (e.g., probiotics, postbiotics, etc.) will provide a basis for targeting manipulation of the microbial composition, which could be used to design adequate strategies for disease prevention and treatment. Recent advances in high-throughput sequencing technologies, such as metagenomics and metatranscriptomics, may help to reach these goals.

Acknowledgments

B. Mora-Sánchez was supported by a fellowship from 'Banco Santander - Universidad de Zaragoza'. J.L. Balcázar acknowledges the support from the Economy and Knowledge Department of the Catalan Government through Consolidated Research Group (ICRA-ENV 2017 SGR 1124). The authors have no conflict of interest.

References

1. FAO (2016) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016: Contributing to Food Security and Nutrition for All*, FAO. <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>
2. Cabello, F.C. *et al.* (2013) Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ. Microbiol.* 15, 1917–1942
3. Watts, J.E.M. *et al.* (2017) The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: sources, sinks and solutions. *Mar. Drugs* 15, 158
4. Chuah, L.O. *et al.* (2016) Antibiotic application and emergence of multiple antibiotic resistance (MAR) in global catfish aquaculture. *Curr. Environ. Health Rep.* 3, 118–127
5. Falaise, C. *et al.* (2016) Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Mar. Drugs* 14, 159
6. Akhter, N. *et al.* (2015) Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 733–741
7. Hai, N.V. (2015) The use of probiotics in aquaculture. *J. Appl. Microbiol.* 119, 917–935
8. Rawls, J.F. *et al.* (2004) Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4596–4601
9. Galindo-Vilegas, J. *et al.* (2012) Regulation of immunity and disease resistance by commensal microbes and chromatin modifications during zebrafish development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2605–E2614
10. Pérez, T. *et al.* (2010) Host–microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunol.* 3, 355–360
11. Lauzon, H.L. *et al.* (2014) Probiotic applications in cold water fish species. In *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics* (Merrifield, D. and Ringo, E., eds), pp. 223–252, John Wiley
12. Klaenhammer, T.R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 39–85
13. Imperial, I.C. and Ibana, J.A. (2016) Addressing the antibiotic resistance problem with probiotics: reducing the risk of its double-edged sword effect. *Front. Microbiol.* 7, 1983
14. Ventura, M. *et al.* (2015) Bifidobacteria of the human gut: our special friends. In *Diet-Microbe Interactions in the Gut: Effects on Human Health and Disease* (Tuohy, K. and Del Rio, D., eds), pp. 41–51, Elsevier
15. Gáñez, A. *et al.* (2012) Bacteriocins. In *Decantamination of Fresh and Minimally Processed Produce* (Gómez-López, V.M., ed.), pp. 317–332, John Wiley
16. Araújo, C. *et al.* (2015) Nisin Z production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* WA2-67 of aquatic origin as a defense mechanism to protect rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) against *Lactococcus garvieae*. *Mar. Biotechnol.* 17, 820–830
17. Lazado, C.C. and Caipang, C.M. (2014) Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 39, 78–89
18. Pérez-Sánchez, T. (2011) Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 196–201
19. Beck, B.R. *et al.* (2015) The effects of combined dietary probiotics *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 on innate immunity and disease resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol.* 42, 177–183
20. Zokaeifar, H. *et al.* (2012) Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 683–689
21. Gibson, G.R. *et al.* (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 17, 259–275
22. Hoseinifar, S.H. *et al.* (2017) Prebiotics and synbiotics. In *Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish* (Austin, B. and Newaj-Fyzul, A., eds), pp. 185–188, John Wiley
23. Huynh, T.G. *et al.* (2017) Current applications, selection, and possible mechanisms of actions of synbiotics in improving the growth and health status in aquaculture: a review. *Fish Shellfish Immunol.* 64, 367–382
24. Van Doan, H. *et al.* (2016) Effects of low molecular weight sodium alginate on growth performance, immunity, and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 55, 186–194
25. Lin, S.M. *et al.* (2017) Effects of *Astragalus* polysaccharides (APS) and chitoooligosaccharides (COS) on growth, immune response and disease resistance of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Fish Shellfish Immunol.* 70, 40–47
26. Irianto, A. and Austin, B. (2003) Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 26, 59–62
27. Dawood, M.A. *et al.* (2015) Interaction effects of dietary supplementation of heat-killed *Lactobacillus plantarum* and β -glucan on growth performance, digestibility and immune response of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 33–42

28. Hoseinifar, S.H. *et al.* (2015) Modulation of innate immune response, mucosal parameters and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) upon synbiotic feeding. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 27–32
29. Van Doan, H. *et al.* (2017) The effects of dietary kefir and low molecular weight sodium alginate on serum immune parameters, resistance against *Streptococcus agalactiae* and growth performance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* 62, 139–146
30. Pires, D.P. *et al.* (2016) Genetically engineered phages: a review of advances over the last decade. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 523–543
31. Quiroz-Guzmán, E. *et al.* (2018) Bacteriophage cocktails as an environmentally-friendly approach to prevent *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* infections in brine shrimp (*Artemia franciscana*) production. *Aquaculture* 492, 273–279
32. Duckworth, D.H. and Gulig, P.A. (2002) Bacteriophages: potential treatment for bacterial infections. *BioDrugs* 16, 57–62
33. Letchumanan, V. *et al.* (2016) Insights into bacteriophage application in controlling *Vibrio* species. *Front. Microbiol.* 7, 1114
34. Jun, J.W. *et al.* (2013) Protective effects of the *Aeromonas* phages pAh1-C and pAh6-C against mass mortality of the cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 416–417, 289–295
35. Silva, Y.J. *et al.* (2016) Biological control of *Aeromonas salmonicida* infection in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with Phage AS-A. *Aquaculture* 450, 225–233
36. Matus, L. *et al.* (2014) Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. *Aquaculture* 424–425, 167–173
37. Stalin, N. and Srinivasan, P. (2017) Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. *Vet. Microbiol.* 207, 83–96
38. Labrie, S.J. *et al.* (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 317–327
39. Allen, H.K. *et al.* (2013) Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends Microbiol.* 21, 114–119
40. Keen, E.C. *et al.* (2017) Novel 'superspreader' bacteriophages promote horizontal gene transfer by transformation. *mBio* 8, e02115-16
41. Na-Phatthalung, P. *et al.* (2018) Immunomodulatory effects of *Rhodomyrtus tomentosa* leaf extract and its derivative compound, rhodomyrtone, on head kidney macrophages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 44, 543–555
42. Zhang, Q. *et al.* (2013) Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Vet. Parasitol.* 198, 45–53
43. Menanteau-Ledouble, S. *et al.* (2015) Effect of a phyto-genic feed additive on the susceptibility of *Oncorhynchus mykiss* to *Aeromonas salmonicida*. *Dis. Aquat. Organ.* 115, 57–66
44. Morales-Covarrubias, M.S. *et al.* (2016) Evaluation of medicinal plants and colloidal silver efficiency against *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei* cultured at low salinity. *Dis. Aquat. Organ.* 122, 57–65
45. Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253
46. Nazzaro, F. *et al.* (2013) Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* 6, 1451–1474
47. Dunford, N.T. and Silva Vazquez, R. (2005) Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. *J. Appl. Hortic.* 7, 20–22
48. Thompson, M. *et al.* (2015) A dietary dairy/yeast prebiotic and flaxseed oil enhance growth, hematological and immunological parameters in channel catfish at a suboptimal temperature (15 °C). *Animal* 9, 1113–1119
49. Kareem, Z.H. *et al.* (2016) Effects of some dietary crude plant extracts on the growth and gonadal maturity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and their resistance to *Streptococcus agalactiae* infection. *Fish. Physiol. Biochem.* 42, 757–769
50. Brackman, G. *et al.* (2011) Structure-activity relationship of cinnamaldehyde analogs as inhibitors of AI-2 based quorum sensing and their effect on virulence of *Vibrio* spp. *PLoS One* 6, e16084
51. Rutherford, S.T. *et al.* (2011) AphA and LuxR/HapR reciprocally control quorum sensing in vibrios. *Genes. Dev.* 25, 397–408
52. Li, Y.H. and Tian, X. (2012) Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors* 12, 2519–2538
53. Zhao, J. *et al.* (2014) Mechanisms of quorum sensing and strategies for quorum sensing disruption in aquaculture pathogens. *J. Fish Dis.* 38, 771–786
54. Defoirdt, T. *et al.* (2011) Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 251–258
55. Kalia, V.C. (2013) Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnol. Adv.* 31, 224–245
56. Vikram, A. *et al.* (2011) Citrus limonoids interfere with *Vibrio harveyi* cell-cell signalling and biofilm formation by modulating the response regulator *LuxO*. *Microbiology* 157, 99–110
57. Pande, G.S. *et al.* (2015) Isolation of AHL-degrading bacteria from micro-algal cultures and their impact on algal growth and on virulence of *Vibrio campbellii* to prawn larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 10805–10813
58. Defoirdt, T. *et al.* (2010) Can bacteria evolve resistance to quorum sensing disruption? *PLoS Pathog.* 6, e1000989
59. Cheng, G. *et al.* (2014) Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? *Front. Microbiol.* 5, 217
60. Patel, R.M. and Denning, P.W. (2013) Therapeutic use of prebiotics, probiotics, and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: what is the current evidence? *Clin. Perinatol.* 40, 11–25
61. Reid, G. *et al.* (2003) New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.* 37, 105–118
62. Defoirdt, T. *et al.* (2007) Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol.* 25, 472–479
63. Hoseinifar, S.H. *et al.* (2017) *In vitro* selection of a synbiotic and *in vivo* evaluation on intestinal microbiota, performance and physiological response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Aquac. Nutr.* 23, 111–118

4.2. Artículo original I

Mora-Sánchez B., Fuertes H., Balcázar J.L., Pérez-Sánchez T. 2020. Effect of a multi-citrus extract-based feed additive on the survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following challenge with *Lactococcus garvieae*. *Acta Veterinaria Scandinavica* 62, 38.

BRIEF COMMUNICATION

Open Access



Effect of a multi-citrus extract-based feed additive on the survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following challenge with *Lactococcus garvieae*

Brenda Mora-Sánchez^{1,2}, Héctor Fuertes¹, José Luis Balcázar^{3,4*}  and Tania Pérez-Sánchez¹

Abstract

Growing global concerns about antibiotic resistance have generated a considerable interest in the search for alternative environmental-friendly approaches. This study was aimed to assess the antimicrobial activity of a multi-citrus extract-based feed additive (Biocitro[®]) against some fish pathogens, as well as evaluate its capacity to protect rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to lactococcosis. A broth dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of Biocitro[®], and the results showed a strong antibacterial activity against *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garvieae* and *Yersinia ruckeri* with MIC values of 2.0 µg/mL. Afterwards, rainbow trout juveniles were fed a Biocitro[®]-enriched diet (750 mg/kg feed) at a daily rate of 1.5% body weight for 4 weeks, then they were challenged with *L. garvieae* by the cohabitation method. At the end of the experimental period, fish treated with Biocitro[®] showed significantly ($P < 0.001$) improved protection against *L. garvieae* compared to control fish. Although further studies are needed to understand how Biocitro[®] increases rainbow trout resistance to *L. garvieae*, this feed additive could be considered as a useful alternative to chemotherapeutic treatment in aquaculture.

Keywords: Antibacterial activity, Biocitro[®], Feed additive, Fish bacterial pathogens, Rainbow trout

Findings

Growing global concerns about antibiotic resistance and limited efficacy of vaccination have prompted the search for alternative environmental-friendly approaches in aquaculture [1]. The use of plant-derived natural compounds (phytobiotics) is gaining a considerable interest as an alternative to antibiotics, which should be restricted to prevent the emergence and spread of antibiotic-resistant bacteria [1–3]. Biocitro[®] (Quinabra; São José dos Campos, SP, Brazil) is a commercially available natural feed additive specifically designed for animal use. According to the manufacturer's specification, the product contains

a defined blend of citrus extracts including grapefruit (*Citrus paradisi*), tangerine (*Citrus reticulata*), bergamot (*Citrus aurantium ssp. bergamia*), and sweet orange (*Citrus sinensis*), whose active compounds are ascorbic acid, citrus bioflavonoids (hesperidin, naringin, quercetin and rutin), and organic acids [4]. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of Biocitro[®] against some fish pathogens, as well as investigate its capacity to protect rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to *Lactococcus garvieae* infection.

The pathogens *Aeromonas salmonicida* (strain CLFP 30), *L. garvieae* (strain CLFP 33) and *Yersinia ruckeri* (strain C4R7), previously isolated from rainbow trout during natural outbreaks and identified by standard microbiological methods, were grown on tryptic soy agar (TSA; Oxoid, Basingstoke, UK) overnight at 22 ± 2 °C. Afterwards, bacteria were collected and resuspended in

*Correspondence: jlbalcazar@icra.cat

³ Catalan Institute for Water Research (ICRA), Girona 17003, Spain
Full list of author information is available at the end of the article



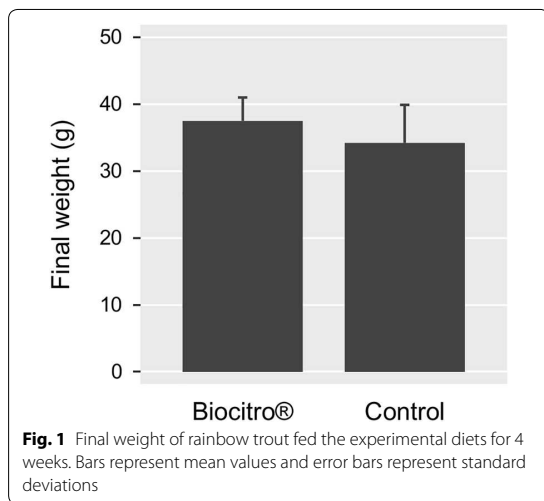
© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). Bacterial suspensions were spectrophotometrically adjusted to an absorbance (600 nm) of 0.125 ± 0.05 , that corresponded to a reference concentration of 10^7 CFU/mL. Serial dilutions of each bacterial suspension were spread onto TSA duplicate plates and the number of colony-forming units (CFUs) was counted after incubation at 22 ± 2 °C, in order to verify the bacterial inoculum concentration. A broth dilution method was then used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of Biocitro® against the three pathogens, according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines [5]. Briefly, a volume of 1.0 mL of Biocitro®, previously filtered, was added to sterile test tubes containing 1.0 mL of tryptic soy broth (TSB) and was serially two-fold diluted to obtain concentrations ranging from 0.25 to 250 µg/mL. The test tubes were then inoculated with 1.0 mL of fresh bacterial cultures at a final concentration of 10^5 CFU/mL. All assays were carried out in triplicate, including also a negative control (with medium only) and a positive control (with the reference antibiotic, oxytetracycline). Moreover, tubes containing bacteria in TSB without any other substance were used to verify bacterial growth whereas a tube containing only TSB without bacteria was used to check medium sterility during the experiments. After 24 h incubation at 22 ± 2 °C, bacterial growth was examined by observing the turbidity of tubes. An absence of turbidity was interpreted as absence of growth whereas the presence of turbidity was interpreted as positive growth. The MIC was defined as the lowest concentration (µg/mL) of Biocitro® or antibiotic that completely inhibited the visible growth of all the three bacterial species, when compared with the TSB control [6]. The results showed that 3.9, 7.8 and 7.8 µg/mL of oxytetracycline inhibited the growth of *A. salmonicida* strain CLFP 30, *L. garvieae* strain CLFP 33 and *Y. ruckeri* strain C4R7, respectively. Similar MIC values have been previously reported against other strains of these bacterial species isolated from farmed fish, shrimp, and their surrounding environment (water and sediment) [7–9]. The results also revealed that 2.0 µg/mL of Biocitro® was enough for inhibiting all tested strains. Other authors have previously shown that citrus extracts possess a strong inhibitory activity against yeasts (*Saccharomyces bayanus*, *Pichia membranifaciens* and *Rhodotorula bacarum*) and bacteria (*Brachyspira hyodysenteriae*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Bacillus coagulans*) [4, 10], thus supporting our results.

To evaluate whether Biocitro® confers to fish beneficial effects against bacterial infections, rainbow trout juveniles were fed a diet supplemented with Biocitro® for 4 weeks and then they were challenged with *L. garvieae*. Briefly, a total of 100 pathogen-free rainbow trout

were obtained from a commercial fish farm (Viveros del Soto Oliván) in the Autonomous Community of Aragon, Spain. After an acclimatization period of 2 weeks, fish (mean body weight 25.0 ± 5.0 g) were randomly assigned to three experimental groups and maintained in three tanks. Specifically, two groups were fed a commercial feed (Inicio Plus 887; BioMar Iberia, S.A., Dueñas, Spain) without any supplement: one group ($n=40$) was used as untreated control and submitted to infection, whereas the other group ($n=20$) was used for the experimental infection as donors. The third group ($n=40$) received a diet obtained by adding Biocitro® to the commercial diet at 750 mg/kg and then was infected. Water quality parameters were measured daily, and temperature (17.0 ± 0.8 °C), dissolved oxygen (6.7 ± 0.5 mg/L), pH (6.9 ± 0.2), nitrite (0.03 ± 0.01 mg/L), and nitrate (0.8 ± 0.2 mg/L) were constant throughout the experiment. All fish were maintained in aerated fresh water with a 25% water change every day and a 12 h dark/12 h light photoperiod, and they were fed daily at 1.5% of their biomass. After 4 weeks of feeding, fish were individually weighed to evaluate the effect of Biocitro® on growth. Subsequently, fish were challenged with *L. garvieae* by cohabitation method [11, 12]. *L. garvieae* cells, previously grown on TSA plates, were collected and resuspended in PBS. Bacterial concentration was spectrophotometrically adjusted to 10^4 CFU/mL, and serial dilutions were spread onto TSA plates to verify the infective dose. A volume of 0.1 mL was intraperitoneally injected into donors, which were previously anaesthetized with tricaine methanesulphonate (Tricaine Pharmaq 1000 mg/g) and marked by clipping the adipose fin. Then, ten infected fish were transferred into the tanks containing the other two experimental groups. All fish were monitored at least three times daily for 2 weeks, and dead fish were immediately removed and examined for external signs of lactococcosis, such as lethargy, irregular swimming behavior, exophthalmia and hemorrhages in the periorbital and intraocular area, perianal region and base of fins. Necropsy results indicated different severity of internal lesions, including enlarged spleen, extensive hemorrhages and ascites.

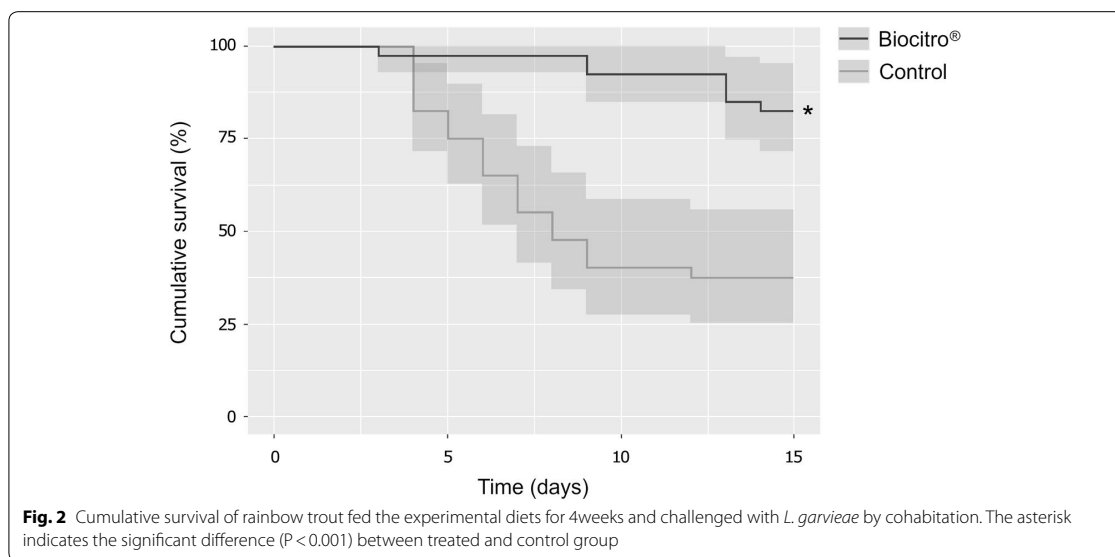
At the end of the experimental period, fish growth data were analyzed using unpaired two-tailed Student's *t* test. Kaplan–Meier survival analysis was performed to investigate statistical differences among the experimental groups ($P < 0.05$). Statistical analyses were performed using R version 3.4.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). No significant difference ($P = 0.30$) was observed in the final weight between fish fed the Biocitro®-enriched diet and control group (Fig. 1). Moreover, no side effects associated with its use was observed. However, a significant difference ($P < 0.001$) in the cumulative survival between



fish fed a Biocitro®-enriched diet and control group was recorded (Fig. 2). Cumulative survivals were 82.5% (95% CI 71.5–95.2%) and 37.5% (95% CI 25.1–55.9%) in treated and control groups, respectively. The relative percent survival (RPS) of treated fish was 72%, calculated as previously described [13]. These results seem to be consistent with previous studies, which revealed that the administration of phytobiotics in fish confers protection against bacterial infections. For instance, another commercially available phyto-genic feed

additive (Digestarom®) conferred protection against *A. salmonicida* to rainbow trout [14], and its dietary supplementation resulted also correlated with a statistically significant reduction of mortality in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) challenged with *Edwardsiella ictaluri* [15]. These evidences suggest a direct antimicrobial activity of Digestarom® that can be ascribable to its active compounds including anethole, carvacrol, limonene and thymol [14, 15]. However, other authors reported that these substances can modulate the immune responses and intestinal microbiota in rainbow trout [16]. Moreover, the inclusion of PHYTO® in the diet reduced the susceptibility of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to *Vibrio anguillarum* [17], which could be related to the antibacterial properties of its active compounds from garlic and labiatae plant extracts.

In conclusion, this study highlighted that Biocitro® could be proposed as alternative to antibiotics for the treatment of fish diseases, being effective in increasing rainbow trout survival to lactococcosis probably by a direct antibacterial activity when administered as feed additive. However, further studies are needed to elucidate the exact mechanisms of its action and investigate whether Biocitro® is also capable to enhance the immune response and/or induces changes in fish intestinal microbiota.



Acknowledgements

B. Mora-Sánchez was supported by a fellowship from “Banco Santander – Universidad de Zaragoza”. ICRA is part of the CERCA Programme of the Catalan Government.

Authors' contributions

TPS and JLB designed the experiments; TPS and BMS performed the experiments; HF and BMS analyzed and interpreted the data; TPS and JLB wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

The study was conducted considering the 3Rs principle (reduction, replacement and refinement). The care and use of fish were performed accordingly with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, Universidad de Zaragoza, Saragossa 50013, Spain. ² Department of Animal Health, Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVEDI), School of Veterinary Medicine, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León, León, Nicaragua. ³ Catalan Institute for Water Research (ICRA), Girona 17003, Spain. ⁴ University of Girona, Girona 17004, Spain.

Received: 6 March 2020 Accepted: 26 June 2020

Published online: 01 July 2020

References

- Pérez-Sánchez T, Mora-Sánchez B, Balcázar JL. Biological approaches for disease control in aquaculture: advantages, limitations and challenges. *Trends Microbiol.* 2018;26:896–903.
- Kareem ZH, Abdelhadi YM, Christianus A, Karim M, Romano N. Effects of some dietary crude plant extracts on the growth and gonadal maturity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and their resistance to *Streptococcus agalactiae* infection. *Fish Physiol Biochem.* 2016;42:757–69.
- Yang C, Chowdhury MA, Huo Y, Gong J. Phytogetic compounds as alternatives to in-feed antibiotics: Potentials and challenges in application. *Pathogens.* 2015;4:137–56.
- de Nova PJ, Carvajal A, Prieto M, Rubio P. In vitro susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* to a commercial citrus fruit extract. *Res Vet Sci.* 2017;115:318–24.
- CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- Lorian V, Atkinson BA. Determination of the range of antibacterial activity by use of viable counts. *J Clin Microbiol.* 1982;16:70–6.
- Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Pedersen K, Larsen JL. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:4908–15.
- Kawanishi M, Kojima A, Ishihara K, Esaki H, Kijima M, Takahashi T, Suzuki S, Tamura Y. Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Lactococcus garvieae* isolates from cultured Seriola (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan. *Lett Appl Microbiol.* 2005;40:322–8.
- Rodgers CJ. Resistance of *Yersinia ruckeri* to antimicrobial agents in vitro. *Aquaculture.* 2001;196:325–45.
- Bevilacqua A, Corbo MR, Sinigaglia M. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of eugenol, limonene, and citrus extract against bacteria and yeasts, representative of the spoiling microflora of fruit juices. *J Food Prot.* 2010;73:888–94.
- Vendrell D, Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Gironés O, Múzquiz JL. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2008;31:337–45.
- Pérez-Sánchez T, Mora-Sánchez B, Vargas A, Balcázar JL. Changes in intestinal microbiota and disease resistance following dietary postbiotic supplementation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Microb Pathog.* 2020;142:104060.
- Amend DF. Potency testing of fish vaccines. In: Hennessen, W. (Ed.), *Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines.* Dev Biol Stand. 1981;49:447–54.
- Menanteau-Ledouble S, Krauss I, Santos G, Fibi S, Weber B, El-Matbouli M. Effect of a phytogetic feed additive on the susceptibility of *Oncorhynchus mykiss* to *Aeromonas salmonicida*. *Dis Aquat Org.* 2015;115:57–66.
- Peterson BC, Peatman E, Ourth DD, Waldbieser GC. Phytogetic feed-additive effects on channel catfish rhamnase-binding lectin levels, and susceptibility to *Edwardsiella ictaluri*. *Dis Aquat Org.* 2018;129:99–106.
- Giannenas I, Triantafillou E, Stavarakakis S, Margaroni M, Mavridis S, Steiner T, et al. Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.* 2012;350–353:26–32.
- Torrecillas S, Terova G, Makol A, Serradell A, Valdenegro V, Gini E, et al. Dietary phytoetics and galactomannan oligosaccharides in low fish meal and fish oil-based diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: Effects on gut health and implications on in vivo gut bacterial translocation. *PLoS ONE.* 2019;14:e0222063.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



4.3. Artículo original II

Mora-Sánchez B., Balcázar J.L., Pérez-Sánchez T. 2020. Effect of a novel postbiotic containing lactic acid bacteria on the intestinal microbiota and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biotechnology Letters* 42, 1957–1962.



Effect of a novel postbiotic containing lactic acid bacteria on the intestinal microbiota and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Brenda Mora-Sánchez · José Luis Balcázar · Tania Pérez-Sánchez

Received: 28 November 2019 / Revised: 7 May 2020 / Accepted: 19 May 2020 / Published online: 25 May 2020
© Springer Nature B.V. 2020

Abstract

Objective This study was aimed to assess the effect of a novel postbiotic on bacterial community composition and structure within the intestinal ecosystem of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), as well as evaluate its capacity to protect rainbow trout from *Lactococcus garvieae* infection.

Results After 30 days of dietary postbiotic supplementation, high-throughput 16S rRNA gene sequencing revealed that bacterial community composition, diversity and richness were significantly higher in treated fish than in control fish. The proportion of sequences affiliated to the phylum Tenericutes, and to a lesser extent, the phyla Spirochaetes and Bacteroidetes was increased in fish fed a postbiotic-enriched diet

compared to control fish, whereas the abundance of Fusobacteria was higher in control fish. Moreover, the treated fish showed significantly ($p < 0.05$) improved protection against *L. garvieae* compared to control fish.

Conclusions These findings suggest that dietary postbiotic supplementation may represent an environmentally friendly strategy for preventing and controlling diseases in aquaculture.

Keywords Rainbow trout · Lactococcosis · Treatment · Postbiotic

B. Mora-Sánchez
Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza, Spain

B. Mora-Sánchez
Department of Animal Health, Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVEDI), School of Veterinary Medicine, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León, León, Nicaragua

J. L. Balcázar
Catalan Institute for Water Research (ICRA), 17003 Girona, Spain

J. L. Balcázar (✉)
University of Girona, 17004 Girona, Spain
e-mail: jlbacazar@icra.cat

T. Pérez-Sánchez
Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2), CITA - Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

T. Pérez-Sánchez
Pentabiol S.L, 31191 Esquíroz, Navarra, Spain

Introduction

Lactococcosis is a disease caused by *Lactococcus garvieae*, which is responsible for severe economic losses in farmed marine and freshwater fish species (Vendrell et al. 2006; Gibello et al. 2016; Meyburgh et al. 2017). Disease outbreaks are usually treated with vaccines or antibiotics. Although vaccination has proven effective in protecting fish from lactococcosis, this immunity lasts a short period of time or the process is often ineffective when applied to immunologically immature fish (Ravelo et al. 2006; Embregts and Forlenza 2016). Moreover, the use of antibiotics should be limited due to the increasing prevalence of antibiotic-resistant bacteria (Cabello et al. 2013; Santos and Ramos 2018). Consequently, new environmentally-friendly strategies for disease prevention and control are urgently needed. Among, the use of postbiotics is becoming increasingly popular for treatment and/or prevention of diseases (Pérez-Sánchez et al. 2018; Ang et al. 2020). Postbiotics are soluble factors (products or metabolic byproducts) secreted by live bacteria or released after bacterial lysis, which may provide physiological benefit to the host (Aguilar-Toalá et al. 2018). Previous studies, including our own, have demonstrated the probiotic effect of some lactic acid bacteria strains under in vitro and in vivo conditions (Vendrell et al. 2008; Pérez-Sánchez et al. 2011; Zheng et al. 2017). However, the efficiency of a postbiotic obtained as a fermented feed product on the lactococcosis prevention has not been previously evaluated. This postbiotic derives from a fermented feed, which has been previously evaluated in animal husbandry (HEALTSTOCK Project, ID 733627; <https://cordis.europa.eu/projects/en>).

Given that postbiotics may be potential alternatives to the use of live probiotic microorganisms, it becomes interesting to explore their effects in species of aquaculture interest. The aim of this study was therefore to investigate the effect of a novel postbiotic obtained as a fermented feed product containing lactic acid bacteria on bacterial community structure and composition within the intestinal ecosystem of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), as well as evaluate its capacity to protect rainbow trout from *L. garvieae* infection.

Materials and methods

Postbiotic and experimental conditions

The postbiotic was obtained as a fermented feed product composed of soy and alfalfa flour. This fermented feed was obtained in two stages. Briefly, a lactic acid bacterium belonging to the genus *Lactobacillus*, previously isolated from rainbow trout and deposited at the Spanish Type Culture Collection (CECT 9882), was grown in de Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS; Oxoid, Basingstoke, UK) overnight at 22 °C. The first stage covered the fermentation of the bacterial pre-culture with other minor components. After the incubation period, bacterial cells were collected and non-bitter beer yeast was added to the raw material and the second fermentation process was then performed, as previously described (Cabello-Olmo et al. 2019). The fermented feed product was micronized to favor the mixture with commercial feed (Inicio Plus 887; BioMar Iberia, S.A., Dueñas, Spain).

A total of 100 pathogen-free rainbow trout weighing 24.6 ± 5.1 g were obtained from a commercial fish farm, which were acclimatized in our experimental fish facility for 2 weeks. The fish were then randomly assigned to three experimental groups and maintained in three tanks. Two groups were fed a commercial feed without any supplement: one group ($n = 40$) was used as untreated control, whereas the other group ($n = 20$) was used for the experimental infection as donors. The third group ($n = 40$) received a diet obtained by adding the postbiotic to the commercial diet at 3.0 mg/g. All fish were fed daily at 1.5% of their biomass.

DNA extraction and sequence analysis

After 30 days of feeding, fish were individually weighed and four fish per treatment were sacrificed to collect the intestinal samples, as previously described (Etyemez and Balcázar 2015). Genomic DNA was extracted using the DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN; Valencia, CA, USA), and the final concentration and purity were determined using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific; Wilmington, DE, USA). Genomic DNA samples were then submitted to MacroGen Inc. (Seoul, Korea) for high-throughput 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. Analysis of 16S rRNA gene

sequences was performed using the MOTHUR software package (Schloss et al. 2009). Briefly, paired-end reads were merged into contigs, screened for quality, aligned to the SILVA reference database, and screened for chimeras. Sequences were then randomly subsampled to contain the same number of sequences (99,729) for further comparisons. Curated sequences were clustered into operational taxonomic units (OTUs) using a 97% similarity cutoff with the average neighbor clustering algorithm. Alpha diversity was calculated using the Shannon diversity index (H') and the Chao1 richness estimator. Beta diversity was calculated using the Yue & Clayton estimator, which measures the number of shared genera and their relative abundances. The relationship among samples was visualized in a principal coordinate analysis (PCoA) plot based on the Yue & Clayton measure of dissimilarity. Analysis of molecular variance (AMOVA) was used to determine whether the clustering within the ordinations is statistically significant at $p < 0.05$.

Experimental infection

After 30 days of feeding, fish were challenged with *L. garvieae* by the cohabitation method. Briefly, *L. garvieae* strain FLP 33, previously isolated during a natural lactococcosis outbreak in rainbow trout, was grown on tryptic soy agar overnight, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS), and adjusted to a concentration of 10^4 CFU/ml. A volume of 0.1 ml of this suspension was injected intraperitoneally into all fish used for cohabitation (the second group), which were anaesthetized with tricaine methanesulfonate (Tricaine Pharmaq 1000 mg/g) and marked by clipping the adipose fin after injection. Ten infected fish were then transferred into the tanks containing the other two experimental groups. All fish were monitored at least three times daily, and dead fish were immediately removed and examined for external signs of lactococcosis.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS Statistics v17.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA). Differences in the final weight and alpha diversity (number of OTUs, Shannon diversity index and Chao richness estimators) were analyzed using an unpaired

two-tailed Student's *t*-test. Survival curves were calculated using the Kaplan–Meier method, and significance was determined using the log-rank test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

After 30 days of feeding, no significant difference ($p = 0.08$) was observed in the final weight between treated (postbiotic) and control groups. Mean final weight of fish was 36.4 ± 7.2 g for treated group and 39.2 ± 6.9 g for control group. Moreover, the number of OTUs observed at a 97% taxonomic cutoff was significantly higher ($p < 0.05$) in the intestinal samples from fish treated with the postbiotic (414 ± 59), as compared to those samples from untreated fish (334 ± 16). Shannon diversity index and Chao richness estimators were also determined, demonstrating that the intestinal samples from treated fish (1.2 ± 0.2 and 4437.9 ± 241.2 , respectively) had significantly higher ($p < 0.01$) bacterial diversity and richness than those samples from untreated fish (0.9 ± 0.1 and 3788.4 ± 262.5 , respectively).

Overall taxonomic characterization of the bacterial community was conducted at the phylum level (Fig. 1). Although Tenericutes and Fusobacteria were found to be the most abundant phyla, there were differences in their abundance between treated and control groups. A higher proportion of sequences affiliated to the phylum Fusobacteria (notably the genus *Cetobacterium*) was found in the intestinal samples from untreated fish (control), as compared to those treated with the postbiotic. In contrast, a higher proportion of sequences affiliated to the phylum Tenericutes (mainly members belonging to the genus *Mycoplasma*) was found in fish treated with the postbiotic, as compared to those of the control group. A slight increase in the abundance of Spirochaetes (notably the genus *Brevinema*) and Bacteroidetes (particularly members belonging to the genera *Bacteroides*, *Dysgonomonas* and *Flavobacterium*) was also observed in fish treated with the postbiotic. At the phylum level, the abundance of sequences affiliated to Proteobacteria, and to a lesser extent, Actinobacteria and Firmicutes was similar between treated and control groups; however, differences were observed at the OTU level (defined at 97% similarity) between the two groups.

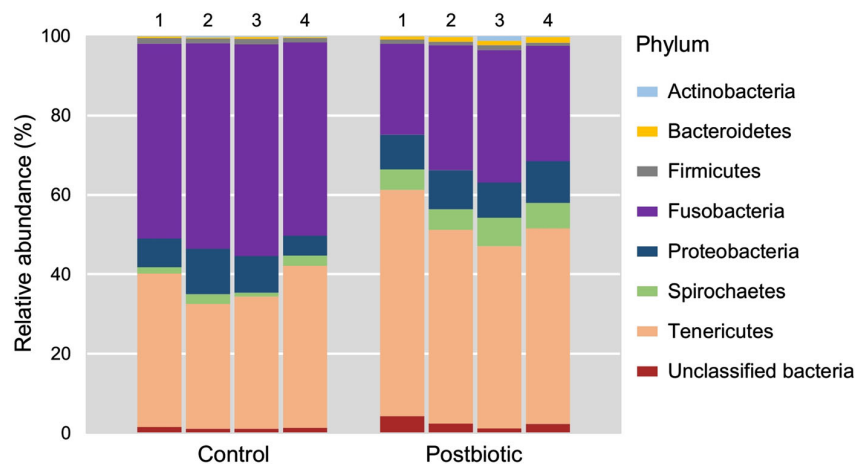


Fig. 1 Relative abundance of dominant bacterial lineages found in the intestinal samples from rainbow trout fed a diet with or without postbiotic for 30 days

The effect of dietary postbiotic supplementation on bacterial community structure within the intestinal ecosystem was determined using a distance matrix based on the Yue & Clayton measure and visualized using PCoA plots (Fig. 2). The results revealed clear separation between treated and control groups. These observations were further validated using AMOVA tests, as implemented by MOTHUR, which showed that bacterial community structure was significantly different ($p < 0.01$) between treated and control groups.

After 30 days of feeding, fish were challenged with *L. garvieae* and Kaplan–Meier analysis revealed a significant difference ($p < 0.05$) in the cumulative survival between treated and control groups (Fig. 3). Cumulative survivals were 75.0 and 52.5% in treated and control groups, respectively.

Discussion

In the present study, we observed that dietary postbiotic supplementation may modify bacterial community composition and structure within the fish intestinal ecosystem. Previous studies have suggested that the manipulation of the host microbiota may represent a valuable strategy to prevent and/or control

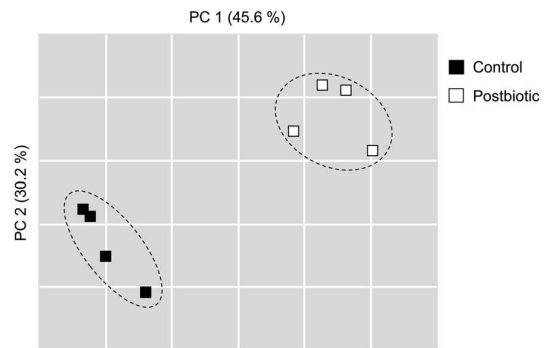


Fig. 2 Bacterial community structure in the intestinal samples from rainbow trout fed a diet with or without postbiotic for 30 days. PCoA plots are based on the Yue & Clayton measure of dissimilarity. The first and second axes represent 45.6% and 30.2% of the variation, respectively

pathological and physiological disorders (Pérez et al. 2010). Although there was no significant difference in the final weight between treated and control groups, possibly due to the short period of the study, we observed that dietary postbiotic supplementation conferred significantly improved protection against *L. garvieae* infection. Postbiotics are nonviable bacterial products or metabolic byproducts from probiotic microorganisms that have biological activity in the host (Patel and Denning 2013). In fact, postbiotics aim to mimic the beneficial effects of probiotics while avoiding the risk of administering live microorganisms. Although the mechanisms underlying their

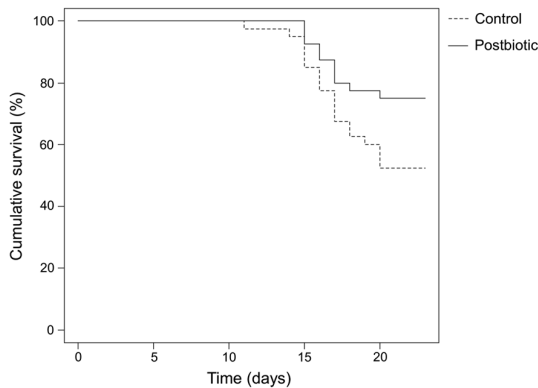


Fig. 3 Cumulative survival of rainbow trout challenged with *L. garvieae* by cohabitation and treated with postbiotic. Survival in the postbiotic group was significantly higher ($p < 0.05$) than the control group according to the Kaplan–Meier method

effects seem to be mediated through an interaction between the host and microbial products, there is limited information on their effects on fish intestinal microbiota. In our study, the proportion of sequences affiliated to Tenericutes, and to a lesser extent, Spirochaetes and Bacteroidetes was increased in the intestinal samples of fish treated with the postbiotic as compared to those of untreated fish, whereas the abundance of Fusobacteria was higher in untreated fish. Interestingly, we observed that all sequences affiliated to the phylum Tenericutes were classified as belonging to the genus *Mycoplasma*, which were dominant in treated fish. A recent study demonstrated that abundance of potential pathogenic *Vibrio* species appeared to be inversely correlated with the presence of *Mycoplasma* species within the mid-intestinal microbiota of farmed Chinook salmon (Ciric et al. 2019). Likewise, a recent study demonstrated that *Mycoplasma* species was the dominant taxon in the gut microbiota of both resistant and susceptible lines of rainbow trout, although it was more abundant in the resistant line (Brown et al. 2019). It is therefore reasonable to assume that disease resistance may be associated with dietary postbiotic supplementation, which increased *Mycoplasma* species levels within the fish intestinal ecosystem. However, further studies are needed to explore the ability of *Mycoplasma* species to prevent bacterial infections.

In conclusion, the ability of a novel postbiotic from lactic acid bacteria to modify the intestinal microbiota and confer disease resistance was elucidated in this

study. These findings, together with evidence from previous studies in other species (Kareem et al. 2016; Izuddin et al. 2019), suggest that dietary postbiotic supplementation may represent a suitable alternative to the use of probiotics, thereby avoiding potential risks of administering live microorganisms.

Acknowledgements B. Mora-Sánchez was supported by a fellowship from “Banco Santander – Universidad de Zaragoza”. J.L. Balcázar acknowledges the support from the Economy and Knowledge Department of the Catalan Government through Consolidated Research Group (ICRA-ENV 2017 SGR 1124). This work has been partially supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL2014-54683-R).

Data availability All data are available on request from the authors.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

Research involving human participants or animals The study was conducted considering the 3Rs principle (reduction, replacement and refinement). The care and use of fish were performed accordingly with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

References

- Aguilar-Toalá JE, Garcia-Varela R, Garcia HS, Mata-Haro V, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B, Hernández-Mendoza A (2018) Postbiotics: an evolving term within the functional foods field. *Trends Food Sci Technol* 75:105–114
- Ang CY, Sano M, Dan S, Leelakriangsak M, Lal TM (2020) Postbiotics applications as infectious disease control agent in aquaculture. *Biocontrol Sci* 25:1–7
- Brown RM, Wiens GD, Salinas I (2019) Analysis of the gut and gill microbiome of resistant and susceptible lines of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 86:497–506
- Cabello FC, Godfrey HP, Tomova A, Ivanova L, Dözl H, Mil-lanao A, Buschmann AH (2013) Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ Microbiol* 15:1917–1942
- Cabello-Olmo M, Oneca M, Torre P, Sainz N, Moreno-Aliaga MJ, Guruceaga E, Díaz JV, Encio JJ, Barajas M, Araña M (2019) A fermented food product containing lactic acid bacteria protects ZDF rats from the development of type 2 diabetes. *Nutrients* 11:2530

- Ciric M, Waite D, Draper J, Jones JB (2019) Characterization of mid-intestinal microbiota of farmed Chinook salmon using 16S rRNA gene metabarcoding. *Arch Biol Sci* 71:577–587
- Embregts CW, Forlenza M (2016) Oral vaccination of fish: Lessons from humans and veterinary species. *Dev Comp Immunol* 64:118–137
- Etyemez M, Balcázar JL (2015) Bacterial community structure in the intestinal ecosystem of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Res Vet Sci* 100:8–11
- Gibello A, Galán-Sánchez F, Blanco MM, Rodríguez-Iglesias M, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF (2016) The zoonotic potential of *Lactococcus garvieae*: an overview on microbiology, epidemiology, virulence factors and relationship with its presence in foods. *Res Vet Sci* 109:59–70
- Izuddin WI, Loh TC, Foo HL, Samsudin AA, Humam AM (2019) Postbiotic *L. plantarum* RG14 improves ruminal epithelium growth, immune status and upregulates the intestinal barrier function in post-weaning lambs. *Sci Rep* 9:9938
- Kareem KY, Loh TC, Foo HL, Akit H, Samsudin AA (2016) Effects of dietary postbiotic and inulin on growth performance, IGF1 and GHR mRNA expression, faecal microbiota and volatile fatty acids in broilers. *BMC Vet Res* 12:163
- Meyburgh CM, Bragg RR, Boucher CE (2017) *Lactococcus garvieae*: an emerging bacterial pathogen of fish. *Dis Aquat Org* 123:67–79
- Patel RM, Denning PW (2013) Therapeutic use of prebiotics, probiotics, and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: what is the current evidence? *Clin Perinatol* 40:11–25
- Pérez T, Balcázar JL, Ruiz-Zarzuola I, Halaihel N, Vendrell D, de Blas I, Múzquiz JL (2010) Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunol* 3:355–360
- Pérez-Sánchez T, Balcázar JL, García Y, Halaihel N, Vendrell D, de Blas I, Merrifield DL, Ruiz-Zarzuola I (2011) Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *J Fish Dis* 34:499–507
- Pérez-Sánchez T, Mora-Sánchez B, Balcázar JL (2018) Biological approaches for disease control in aquaculture: advantages, limitations and challenges. *Trends Microbiol* 26:896–903
- Ravelo C, Magariños B, Herrero MC, Costa L, Toranzo AE, Romalde JL (2006) Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 251:153–158
- Santos L, Ramos F (2018) Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem. *Int J Antimicrob Agents* 52:135–143
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541
- Vendrell D, Balcázar JL, Ruiz-Zarzuola I, de Blas I, Gironés O, Múzquiz JL (2006) *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 29:177–198
- Vendrell D, Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Gironés O, Múzquiz JL (2008) Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31:337–345
- Zheng X, Duan Y, Dong H, Zhang J (2017) Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* in different treatments on growth performance and immune gene expression of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under normal condition and stress of acute low salinity. *Fish Shellfish Immunol* 62:195–201

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4.4. Artículo original III

Pérez-Sánchez T., Mora-Sánchez B., Vargas A., Balcázar J.L. 2020. Changes in intestinal microbiota and disease resistance following dietary postbiotic supplementation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Microbial Pathogenesis* 142, 104060.



Changes in intestinal microbiota and disease resistance following dietary postbiotic supplementation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Tania Pérez-Sánchez^{a,b}, Brenda Mora-Sánchez^{c,d}, Augusto Vargas^e, José Luis Balcázar^{f,g,*}

^a Navarran European Business Innovation Center (CEIN), 31110, Noáin (Navarra), Spain

^b Pentabiol S.L., 31191, Esquíroz (Navarra), Spain

^c Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, Universidad de Zaragoza, 50013, Zaragoza, Spain

^d Department of Animal Health, Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVEDI), School of Veterinary Medicine, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León, Nicaragua

^e Laboratory of Biotechnology and Aquatic Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, Universidad Austral de Chile, 5090000, Valdivia, Chile

^f Catalan Institute for Water Research (ICRA), 17003, Girona, Spain

^g University of Girona, 17004, Girona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Rainbow trout
Lactococcosis
Dysbiosis
Lactic acid bacteria
Postbiotic

ABSTRACT

This experimental study was aimed to investigate whether the dietary supplementation of a postbiotic obtained as a food product fermented with two lactic acid bacteria could induce changes in the intestinal microbiota and prevent the development of *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). After 30 days of dietary postbiotic supplementation, bacterial community composition and structure was significantly different between the treated and control groups. A higher bacterial diversity and richness in the intestinal samples was found in treated fish, as compared to those samples from untreated fish. Dietary postbiotic supplementation also conferred increased protection against *L. garvieae* infection. These findings suggest that the establishment of a beneficial microbiota is essential to prevent diseases or protect the host from foreign agents.

1. Introduction

Antimicrobial resistance has become a global health threat that requires a coordinated action at the human-animal-environment interface [1]. Aquaculture production is not exempt from these threats because antibiotics are still used for treating fish and shellfish diseases [2–4]. Alternative strategies are therefore urgently needed to tackle this serious and growing threat [5,6]. The use of postbiotics may be a viable alternative approach for preventing and controlling infections. Broadly speaking, the term “postbiotics” refers to soluble factors (products or metabolic byproducts) secreted by live bacteria or released after bacterial lysis, which may provide physiological benefit to the host [7]. Although previous studies have provided plausible evidence of several mechanisms underlying the health-promoting effects of desirable intestinal bacteria or probiotics; recent evidence suggests that bacterial viability is not necessary to develop health-promoting effects [7,8]. As a consequence, the use of postbiotics has emerged as a novel and safe strategy to confer health benefits to the host, while avoiding the potential risk of administering live bacteria. Two lactic acid bacteria belonging to the genus *Lactobacillus* and *Leuconostoc* were selected for this

study, which were originally isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). These strains exhibited antagonistic activity against *Lactococcus garvieae* under *in vitro* conditions, whose antimicrobial substances were sensitive to proteolytic enzymes. This study was therefore aimed to investigate the effect of a lactic acid bacteria-based postbiotic on intestinal bacterial communities of rainbow trout, as well as to determine its capacity to protect against *L. garvieae* infection.

2. Materials and methods

2.1. Fish and experimental conditions

A total of 160 healthy rainbow trout were obtained from a commercial fish farm. After the acclimatization period for two weeks, the mean fish mass was 24.1 ± 7.4 g. The fish were then randomly assigned to three groups. The first two groups were fed a commercial feed (AQUASOJA, Portugal) without any supplement. The first group ($n = 70$) served as the control, whereas the second group ($n = 20$) served to keep fish that were used for experimental infection. The third group ($n = 70$) received the same feed to which the postbiotic, at a

* Corresponding author. Catalan Institute for Water Research (ICRA), 17003, Girona, Spain.

E-mail address: jbalcazar@icra.cat (J.L. Balcázar).

concentration of 3.0 mg/g, was added by the manufacturer (AQUAS-OJA). The postbiotic was obtained as a fermented food product composed by soy and alfalfa flour, in which two lactic acid bacteria were added in similar concentrations. The fermentation process was then performed, as previously described [9]. The fermented food product was micronized before sending to the manufacturer. All fish were fed daily an amount equal to 1.5% of their biomass.

2.2. Sample collection and sequence analysis

After four weeks of treatment, fish were individually weighed to evaluate the effect of dietary postbiotic supplementation on growth. Moreover, four fish per treatment were sacrificed to collect the intestinal samples, as previously described [10]. Genomic DNA was extracted using the DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN; Valencia, CA, USA) and submitted to MacroGen Inc. (Seoul, Korea) for high-throughput 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. Analysis of 16S rRNA gene sequences was performed using the MOTHUR software package [11]. Briefly, sequences were aligned and clustered into operational taxonomic units (OTUs) using a 97% similarity cutoff. Selected OTUs were classified using the EzBioCloud database [12]. Alpha diversity was calculated using the Shannon diversity index (H') and the Chao1 richness estimator. Beta diversity was calculated using the Bray-Curtis dissimilarity metric and visualized with principal coordinate analysis (PCoA) plots. Analysis of molecular variance (AMOVA) was used to test for differences in community structure.

2.3. Experimental infection

Immediately after weighing and collecting intestinal samples, fish were challenged with *L. garvieae* by the cohabitation method. A volume of 0.1 ml of a bacterial suspension (*L. garvieae* at 10^4 CFU/ml) was injected intraperitoneally into all fish used for cohabitation (the second group), which were anaesthetized with tricaine methanesulfonate (Tricaine Pharmaq 1000 mg/g) and marked by clipping the adipose fin after injection. Ten infected fish were transferred into each group (the first and third group). All fish were monitored at least three times daily, and dead fish were immediately removed and examined for external disease signs.

2.4. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS Statistics v17.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA). Differences in the final weight were analyzed using Mann-Whitney U test because data sets were not homogeneous for variance. Alpha diversity (Shannon diversity and Chao1 richness indices) was analyzed using an unpaired two-tailed Student's t -test. Survival curves were calculated using the Kaplan-Meier method, and significance was determined using the log-rank test. In all cases, the level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

In this study, we initially observed that postbiotic (a food product fermented with two lactic acid bacteria) did not exert any side effects on fish growth. In fact, there was slight increase in the weight of fish treated with postbiotic after four weeks; however, the differences were not significant ($p = 0.07$) between the treated (postbiotic) and control groups, whose mean values were 47.5 ± 12.8 g and 44.2 ± 10.1 g, respectively.

After four weeks of dietary postbiotic supplementation, we also observed that bacterial communities in the intestinal samples from treated fish had significantly ($p < 0.01$) higher diversity (3.7 ± 0.7) and richness ($10,544.7 \pm 1711.6$) than those samples from untreated fish (1.9 ± 0.3 and 3436.8 ± 1114.4 , respectively). Moreover, we observed that bacterial community structure was significantly different

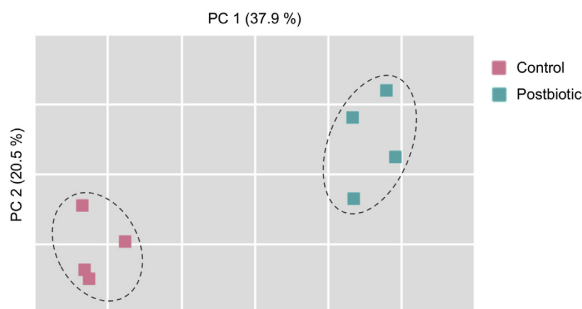


Fig. 1. Bacterial community structure in the intestinal samples from rainbow trout fed a diet with or without postbiotic for 30 days. PCoA plots are based on the Bray-Curtis dissimilarity metric. The first and second axes represent 37.9% and 20.5% of the variation, respectively.

($p = 0.02$) between the treated and control groups, which was determined using a distance matrix based on the Bray-Curtis dissimilarity metric and visualized using PCoA plots (Fig. 1). There were large differences in bacterial community composition between treatment and control groups (Fig. 2). A higher proportion of sequences affiliated to the phylum Proteobacteria ($48.9 \pm 5.8\%$), and to a lesser extent, Fusobacteria ($6.1 \pm 0.5\%$) was found in the intestinal samples from untreated fish, as compared to those treated with the postbiotic ($36.1 \pm 14.7\%$ and $2.4 \pm 0.9\%$, respectively). Moreover, sequences affiliated to the phylum Planctomycetes ($9.0 \pm 5.6\%$) were only detected in untreated fish. Although bacterial communities in treated fish were also dominated by the phylum Proteobacteria, differences were observed at the OTU level (defined at 97% similarity) between treatment and control groups. For instance, a high proportion of sequences assigned to the genus *Desulfovibrio* was found in the intestinal samples from untreated fish. This reinforces the use of dietary postbiotic because some *Desulfovibrio* species can have important health implications, such as bacteremia caused by *Desulfovibrio desulfuricans* [13]. Likewise, OTUs affiliated to the genera *Enhydrobacter*, *Paracoccus* and *Pseudomonas* were only detected in the intestinal samples from treated fish. Some members belonging to these genera are ubiquitous in aquatic environments and have been found to produce antibacterial compounds and polyunsaturated fatty acids [14,15]. A higher proportion of sequences affiliated to the phyla Firmicutes ($19.6 \pm 5.3\%$) and Actinobacteria ($9.5 \pm 2.7\%$) was also found in treated fish, as compared to those of the untreated group ($5.1 \pm 3.7\%$ and $0.6 \pm 0.3\%$, respectively). Interestingly, a relatively high proportion of sequences affiliated to the phylum Firmicutes was found in treated fish, which were classified as belonging to the genus *Lactobacillus* (notably the species *Lb. amylovorus*). Previous studies have demonstrated that *Lactobacillus* species may exert several beneficial effects on the host, including immunomodulation, interference with potential pathogens, and maintenance of a healthy intestinal microbiota [16–18]. Although the antimicrobial substances of the two lactic acid bacteria used for the fermentation process were not identified in this study, these substances are sensitive to proteolytic enzymes, suggesting that they might be bacteriocins. Bacteriocins are ribosomally synthesized peptides or proteins that are generally effective against closely related species [19]. It is therefore expected that dietary postbiotic supplementation can induce or restore a disturbed microbiota to its normal beneficial composition, thereby providing protection through the creation of a hostile environment for potential pathogens.

In order to reinforce the idea that dietary postbiotic supplementation may confer protection against infections, fish were challenged with *L. garvieae* which is a serious fish pathogen responsible for lactococcosis. This disease produces hyperacute and hemorrhagic septicemia in several farmed fish species worldwide [20,21]. Statistical analysis

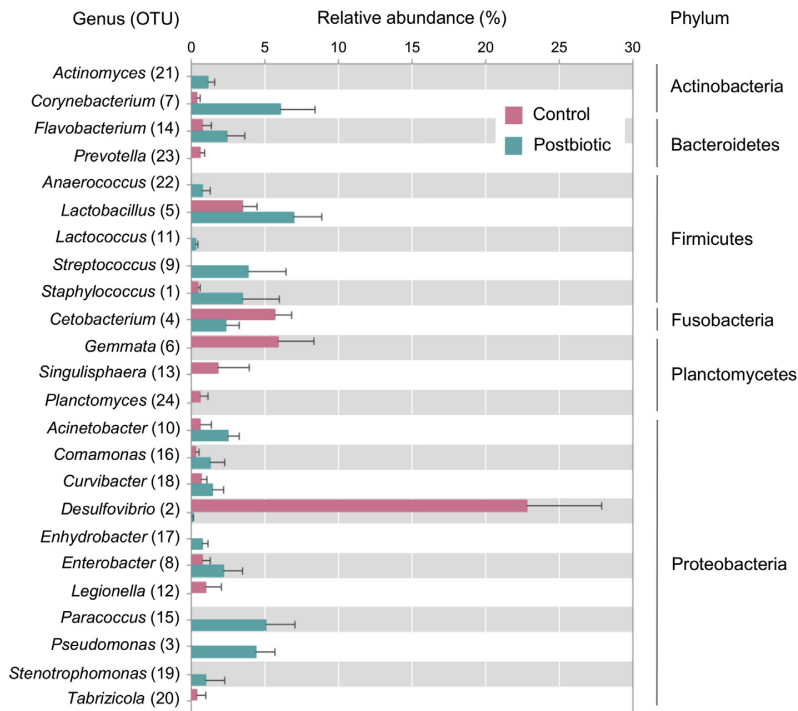


Fig. 2. Relative abundance of dominant genera found in the intestinal samples from rainbow trout fed a diet with or without postbiotic for 30 days.

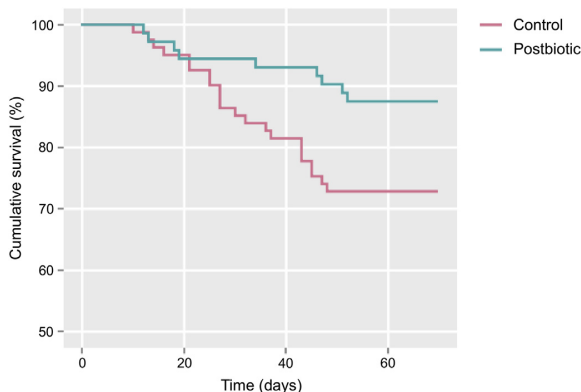


Fig. 3. Cumulative survival of rainbow trout challenged with *L. garvieae* by cohabitation and treated with postbiotic. Survival in the postbiotic group was significantly higher ($p = 0.02$) than the control group according to the Kaplan–Meier method.

revealed significant differences (log-rank test, $p = 0.02$) in fish survival between the treatment and control groups (Fig. 3). Cumulative survivals of the treatment and control groups were 87.5 and 72.8%, respectively. These findings, together with evidence from previous studies, suggest that manipulation of the intestinal microbiota may represent a valuable strategy to increase fish survival rates. To date, manipulation of the intestinal microbiota through probiotics has demonstrated encouraging results to control *L. garvieae* infection [16,17,22]. To our knowledge, however, this is the first study demonstrating beneficial effects of dietary postbiotic administration against *L. garvieae* infection in fish.

4. Conclusions

In summary, we observed that dietary postbiotic supplementation may provide a viable alternative to antibiotics, avoiding the risk of administering live bacterial cells that could transfer antibiotic resistance genes. Postbiotics can both increase bacterial diversity and richness within the intestinal ecosystem, and create a hostile environment for the pathogen by interfering with pathogen colonization, which was demonstrated by high-throughput 16S rRNA gene sequence analysis of fish intestinal samples. This novel dietary strategy has demonstrated promising results to prevent an important disease without the need for handling fish, and confer a beneficial microbiota with the ability to protect the host from pathogens and other foreign agents.

Data availability

All data are available on request from the authors.

Ethics approval

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (Project License PI57/17) of the Universidad de Zaragoza, Spain.

CRedit authorship contribution statement

Tania Pérez-Sánchez: Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Brenda Mora-Sánchez:** Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing - original draft. **Augusto Vargas:** Formal analysis, Methodology. **José Luis Balcázar:** Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgments

B. Mora-Sánchez was supported by a fellowship from “Banco Santander – Universidad de Zaragoza”. J.L. Balcázar acknowledges the support from the Economy and Knowledge Department of the Catalan Government through Consolidated Research Group (ICRA-ENV 2017 SGR 1124).

References

- [1] D. Destoumieux-Garzón, P. Mavingui, G. Boetsch, J. Boissier, F. Darriet, P. Duboz, C. Fritsch, P. Giraudoux, F. Le Roux, S. Morand, C. Paillard, D. Pontier, C. Sueur, Y. Voituren, The One Health Concept: 10 years old and a long road ahead, *Front. Vet. Sci.* 5 (2018) 14, <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00014>.
- [2] F.C. Cabello, H.P. Godfrey, A.H. Buschmann, H.J. Dölz, Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance, *Lancet Infect. Dis.* 16 (2016) e127–e133, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00100-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00100-6).
- [3] C.D. Miranda, F.A. Godoy, M.R. Lee, Current status of the use of antibiotics and the antimicrobial resistance in the Chilean salmon farms, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 1284, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01284>.
- [4] L. Santos, F. Ramos, Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem, *Int. J. Antimicrob. Agents* 52 (2018) 135–143, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010>.
- [5] T. Lieke, T. Meinelt, S.H. Hoseinifar, B. Pan, D.L. Straus, C.E.W. Steinberg, Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish diseases, *Rev. Aquacult.* 2020 (in press) <https://doi.org/10.1111/raq.12365>.
- [6] T. Perez-Sanchez, B. Mora-Sanchez, J.L. Balcázar, Biological approaches for disease control in aquaculture: advantages, limitations and challenges, *Trends Microbiol.* 26 (2018) 896–903, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.002>.
- [7] J.E. Aguilar-Toalá, R. Garcia-Varela, H.S. Garcia, V. Mata-Haro, A.F. González-Córdova, B. Vallejo-Cordoba, A. Hernández-Mendoza, Postbiotics: an evolving term within the functional foods field, *Trends Food Sci. Technol.* 75 (2018) 105–114, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009>.
- [8] C.A.M. Wegh, S.Y. Geerlings, J. Knol, G. Roeselers, C. Belzer, Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 4673, <https://doi.org/10.3390/ijms20194673>.
- [9] M. Cabello-Olmo, M. Oneca, P. Torre, N. Sainz, M.J. Moreno-Aliaga, E. Guruceaga, J.V. Díaz, I.J. Encio, M. Barajas, M. Araña, A fermented food product containing lactic acid bacteria protects ZDF rats from the development of type 2 diabetes, *Nutrients* 11 (2019) 2530, <https://doi.org/10.3390/nu11102530>.
- [10] M. Etyemez, J.L. Balcázar, Bacterial community structure in the intestinal ecosystem of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes, *Res. Vet. Sci.* 100 (2015) 8–11, <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.03.026>.
- [11] P.D. Schloss, S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R.A. Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, J.W. Sahl, B. Stres, G.G. Thallinger, D.J. Van Horn, C.F. Weber, Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 7537–7541, <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>.
- [12] S.H. Yoon, S.M. Ha, S. Kwon, J. Lim, Y. Kim, H. Seo, J. Chun, Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67 (2017) 1613–1617, <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>.
- [13] H. Hagiya, K. Kimura, I. Nishi, N. Yamamoto, H. Yoshida, Y. Akeda, K. Tomono, *Desulfovibrio desulfuricans* bacteremia: a case report and literature review, *Anaerobe* 49 (2018) 112–115, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.12.013>.
- [14] L. Gram, J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber, T.F. Nielsen, Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 969–973.
- [15] K.M. Wanka, T. Damerau, B. Costas, A. Krueger, C. Schulz, S. Wuertz, Isolation and characterization of native probiotics for fish farming, *BMC Microbiol.* 18 (2018) 119, <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1260-2>.
- [16] D. Vendrell, J.L. Balcázar, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, O. Gironés, J.L. Múzquiz, Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 31 (2008) 337–345, <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.04.002>.
- [17] T. Pérez-Sánchez, J.L. Balcázar, D.L. Merrifield, O. Carnevali, G. Gioacchini, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection, *Fish Shellfish Immunol.* 31 (2011) 196–201, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.05.005>.
- [18] X. Zheng, Y. Duan, H. Dong, J. Zhang, Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* in different treatments on growth performance and immune gene expression of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under normal condition and stress of acute low salinity, *Fish Shellfish Immunol.* 62 (2017) 195–201, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.01.015>.
- [19] R.W. Jack, J.R. Tagg, B. Ray, Bacteriocin of gram-positive bacteria, *Microbiol. Rev.* 59 (1995) 171–200.
- [20] D. Vendrell, J.L. Balcázar, I. Ruiz-Zarzuela, I. de Blas, O. Gironés, J.L. Múzquiz, *Lactococcus garvieae* in fish: a review, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 29 (2006) 177–198, <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2006.06.003>.
- [21] C.M. Meyburgh, CE Boucher RR Bragg, *Lactococcus garvieae*: an emerging bacterial pathogen of fish, *Dis. Aquat. Org.* 123 (2017) 67–79, <https://doi.org/10.3354/dao03083>.
- [22] J. Brunt, B. Austin, Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *J. Fish. Dis.* 28 (2005) 693–701, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00672.x>.

4.5. Artículo original IV

Mora-Sánchez B., Pérez-Sánchez T., Balcázar J.L. 2020. Phylogenetic analysis of intestinal microbiota reveals novel *Mycoplasma* phylotypes in salmonid species. *Microbial Pathogenesis* 145, 104210.



Phylogenetic analysis of intestinal microbiota reveals novel *Mycoplasma* phylotypes in salmonid species



Brenda Mora-Sánchez^{a,b}, Tania Pérez-Sánchez^{c,d}, José Luis Balcázar^{e,f,*}

^a Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, Universidad de Zaragoza, 50013, Zaragoza, Spain

^b Department of Animal Health, Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVEDI), School of Veterinary Medicine, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León, Nicaragua

^c Navarran European Business Innovation Center (CEIN), 31110, Noáin (Navarra), Spain

^d Pentabiol S.L., 31191, Esquíroz (Navarra), Spain

^e Catalan Institute for Water Research (ICRA), 17003, Girona, Spain

^f University of Girona, 17004, Girona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Phylogenetic analysis
Mycoplasma species
Salmonids

ABSTRACT

This study describes the bacterial community composition within the intestinal ecosystem of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using high-throughput 16S rRNA gene sequence analysis. Sequences from intestinal samples from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) farmed in New Zealand and rainbow trout farmed in Turkey were also included for comparative purposes. The results revealed that the most abundant operational taxonomic units (OTUs) were affiliated to the genus *Mycoplasma*, but were not specifically associated with any known species. Comparative analysis of 16S rRNA gene sequences indicated that these OTUs represent potentially novel species within the genus *Mycoplasma*.

1. Introduction

The advent of high-throughput sequencing technologies has led to significant advances in our understanding of bacterial community composition and abundance in diverse environments [1]. These advances have allowed us to discover bacterial species that have not been identified before. For instance, previous high-throughput sequencing studies have demonstrated that 16S rRNA gene sequences affiliated to the genus *Mycoplasma* are abundant within the fish intestinal ecosystem; however, it has not been possible to assign those sequences to any known species [2,3]. Moreover, there is substantial evidence that the intestinal microbiota plays an important role in host metabolism, immunity and health maintenance [4]. As a consequence, further studies are undoubtedly needed to identify members belonging to the intestinal microbiota and their relative abundance. We therefore used the Illumina sequencing technology to explore the bacterial community composition within the intestinal ecosystem of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), with particular emphasis on members belonging to the genus *Mycoplasma*.

2. Materials and methods

Three healthy rainbow trout (40.0 g) were collected from our experimental facilities, which have been fed a commercial diet (BioMar Iberia, S.A., Dueñas, Spain). Fish were then sacrificed to collect the intestinal samples, as previously described [2]. Genomic DNA was extracted using the DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN; Valencia, CA, USA), and submitted to Macrogen Inc. (Seoul, Korea) for high-throughput 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. Raw 16S rRNA gene sequences from previous studies in salmonid species were retrieved from the Sequence Read Archive database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) and used for comparative purposes. The retrieved sequences corresponded to intestinal samples from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) farmed in New Zealand [5] and rainbow trout farmed in Turkey [6]. Analysis of 16S rRNA gene sequences was performed using the MOTHUR software package [7]. Paired-end sequences were merged, quality-filtered, aligned and clustered into operational taxonomic units (OTUs) using a 97% similarity cutoff. This value was also used to define a core set of representative sequences, which were used for phylogenetic analyses. A heatmap was generated showing the relative abundance of specific OTUs across the samples. Selected OTUs were originally classified using the EzBioCloud

* Corresponding author. Catalan Institute for Water Research (ICRA), 17003, Girona, Spain.
E-mail address: jbalcazar@icra.cat (J.L. Balcázar).

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104210>

Received 12 February 2020; Received in revised form 14 April 2020; Accepted 15 April 2020

Available online 18 April 2020

0882-4010/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

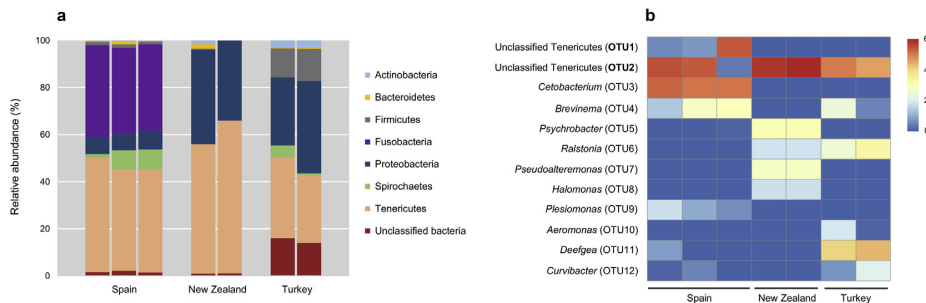


Fig. 1. (a) Relative abundance of dominant phyla found in the intestinal samples from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farmed in Spain and Turkey, as well as from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) farmed in New Zealand. (b) Heatmap of the most abundant OTUs, which were compared with their abundances in each sample. The color intensity (log₂ scale) in each panel shows the percentage of each OTU.

database [8]. These OTUs were also compared against the sequences available in the GenBank, EMBL, and DDBJ databases obtained from the National Center for Biotechnology Information by using the BLAST program [9]. Phylogenetic analyses were performed by using MEGA version 6.0 [10]. Distances (distance options according to the Kimura 2-parameter model) and clustering with the neighbor-joining method were determined by using bootstrap values for 1000 replications.

3. Results

The sequence number of each sample was normalized to the smallest number (8845 sequences) in order to minimize any bias due to the difference in the total number of sequences. The analysis demonstrated that there were large differences in bacterial community composition among fish species according to their location (Fig. 1a). Although a high proportion of sequences affiliated to the phylum Tenericutes was found in the intestinal samples from all fish species, there were marked differences among the remaining phyla according to the location. For instance, a high proportion of sequences affiliated to the phylum Fusobacteria was also found in rainbow trout from Spain, whereas sequences affiliated to the phylum Proteobacteria were dominant in fish from New Zealand and Turkey. However, a relatively high proportion of sequences affiliated to the phylum Firmicutes were only detected in rainbow trout from Turkey. These differences were confirmed using the unweighted (sensitive to rarer taxa) and weighted (sensitive to abundances of taxa) UniFrac tests, as implemented by MOTHUR, which showed that while the fish intestinal samples have similar memberships according their location, the relative abundances of each OTU are different.

The twelve most abundant OTUs in each sample were selected and compared with their abundance in each sample (Fig. 1b). All OTUs were identified to the genus level, except those OTUs belonging to the phylum Tenericutes. Because these OTUs were found to be dominant in the intestinal samples from all fish species, a phylogenetic analysis was carried out to establish their taxonomic affiliation. The results demonstrated that the sequences belonging to these OTUs (OTU1 and OTU2) formed distinct clades within the family *Mycoplasmataceae*, but were not specifically associated with any known species in the family (Fig. 2). Sequence similarity calculations based on a neighbor-joining analysis revealed that OTU1 and OTU2 grouped most closely with uncultured bacterial clones. The closest described relatives of OTU1 were *Mycoplasma muris* ATCC 33757^T (93.86%), *Mycoplasma microti* IL371^T (93.57%), *Mycoplasma penetrans* GTU-54-6A1^T (92.40%) and *Mycoplasma iowae* ATCC 33552^T (90.06), whereas OTU2 was related to *Mycoplasma moatsii* MK405^T (93.28%) and *Mycoplasma sualvi* ATCC 33004^T (91.89%).

4. Discussion

In the present study, we observed that members belonging to the phylum Tenericutes were found to be abundant in the intestinal samples from all studied fish regardless of their origin. These intestinal samples were obtained from fish species from different locations (New Zealand, Spain and Turkey), thus validating the reliability of our findings. Moreover, all sequences affiliated to the phylum Tenericutes were classified as belonging to the family *Mycoplasmataceae*, but were not specifically associated with any officially described species. However, a phylogenetic analysis using reference sequences and sequences available in the GenBank, EMBL, and DDBJ databases revealed that those sequences, represented by OTU1 and OTU2, were closely related to uncultured bacterial clones. The sequences belonging to OTU1 were only dominant in one of our samples (rainbow trout farmed in Spain), whereas none of the sequences from fish samples from New Zealand and Turkey were assigned to OTU1. However, OTU1 was closely related to uncultured bacterial clones from fish species, especially the clone BHJA (GenBank accession number AY065998, 99.62% sequence identity) previously detected in farmed and wild salmon (*Salmo salar*) from Norway and Scotland [11]. Interestingly, the sequences belonging to OTU2 were found to be dominant in all studied fish, except in one of our samples. Likewise, OTU2 was closely related to uncultured bacterial clones from fish species from different locations, especially the clone P2C8 (GenBank accession number MN833643, 99.65% sequence identity) previously detected in farmed rainbow trout from Spain. Further analysis also demonstrated that these OTUs should be included in the genus *Mycoplasma*. Although these OTUs do not meet the minimum standards for description of novel species of the genus *Mycoplasma* because they were not cultured, phylogenetic analyses and potential significance warrant a taxonomic proposal in accordance with the guidelines for a designation of a provisional ‘*Candidatus* species’ [12]. Unfortunately, the 16S rRNA gene sequences of OTU1 and their relatives (e.g., clone BHJA) are about 400 bp long, which do not meet the minimum required conditions [13,14]. According to the Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology, all species descriptions should include an almost complete 16S rRNA gene sequence (> 1300 bp) [13]. Although the sequence of OTU1 is about 400 bp long, the 16S rRNA gene sequence of its closest relative (clone P2C8) meets the required conditions. Based on the comparative analysis of 16S rRNA gene sequences, OTU2 and its closest relative (clone P2C8) represent a novel ‘*Candidatus*’ species within the genus *Mycoplasma*, for which the name ‘*Candidatus* *Mycoplasma tructae*’ (truc^t.a.e L. gen. n. *tractae* of a trout) is proposed. The description of this novel ‘*Candidatus*’ species is also supported both by the abundance of sequences assigned to OTU1 and by its geographic distribution in fish species. The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of ‘*Ca. Mycoplasma tructae*’ is MN833643.

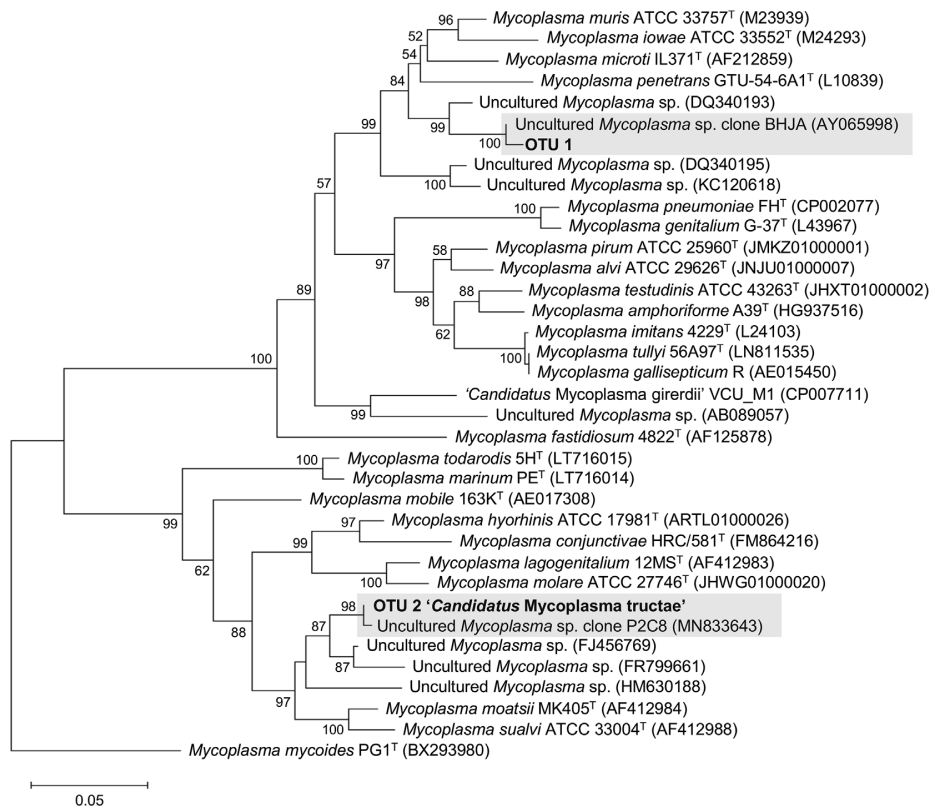


Fig. 2. Phylogenetic dendrogram of both OTUs with the most closely related *Mycoplasma* species, based on 16S rRNA gene sequences and constructed by the neighbor-joining method. Bootstrap percentages based on 1000 replications are shown at branch nodes. *Mycoplasma mycoides* PG1^T was used as an outgroup. Bar, 5% estimated sequence divergence.

Although these potentially novel species were detected in apparently healthy fish species, further studies are needed to isolate these *Mycoplasma* species and to determine if they can cause clinical manifestations. Interestingly, a recent study demonstrated that sequences affiliated to unclassified *Mycoplasma* species were more abundant in the gut microbiota of *Flavobacterium psychrophilum*-resistant lines of rainbow trout than those of susceptible lines [3]. These observations warrant further studies to assess their potential implications to fish health status.

Authors' contributions

BMS: Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft. **TPS:** Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition. **JLB:** Conceptualization, Formal analysis, Resources, Supervision, Writing - Review & Editing.

Data availability

All sequences obtained in this study are available under SRA BioProject PRJNA601881. Other datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval

This study was performed according to the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union

Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

Declaration of interest

None.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

B. Mora-Sánchez was supported by a fellowship from “Banco Santander – Universidad de Zaragoza”. J.L. Balcázar acknowledges the support from the Economy and Knowledge Department of the Catalan Government through Consolidated Research Group (ICRA-ENV 2017 SGR 1124).

References

- [1] P.J. Torres, S.T. Kelley, Sampling, extraction, and high-throughput sequencing methods for environmental microbial and viral communities, in: S. Head, P. Ordoukhanian, D. Salomon (Eds.), Next Generation Sequencing, Methods in Molecular Biology, vol 1712, Humana Press, New York, 2018, pp. 163–173.
- [2] M. Etyemez, J.L. Balcázar, Bacterial community structure in the intestinal ecosystem of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes, Res. Vet. Sci. 100 (2015) 8–11.
- [3] R.M. Brown, G.D. Wiens, I. Salinas, Analysis of the gut and gill microbiome of resistant and susceptible lines of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Fish Shellfish

- Immunol. 86 (2019) 497–506.
- [4] T. Perez, J.L. Balcázar, I. Ruiz-Zarzuela, N. Halaihel, D. Vendrell, I. de Blas, J.L. Múzquiz, Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem, *Mucosal Immunol.* 3 (2010) 355–360.
- [5] M. Ciric, D. Waite, J. Draper, J.B. Jones, Characterization of mid-intestinal microbiota of farmed Chinook salmon using 16S rRNA gene metabarcoding, *Arch. Biol. Sci.* 71 (2019) 577–587.
- [6] M. Etyemez Büyükdeveci, J.L. Balcázar, I. Demirkale, S. Dikel, Effects of garlic-supplemented diet on growth performance and intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture* 486 (2018) 170–174.
- [7] P.D. Schloss, S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R.A. Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, J.W. Sahl, B. Stres, G.G. Thallinger, D.J. Van Horn, C.F. Weber, Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 7537–7541.
- [8] S.H. Yoon, S.M. Ha, S. Kwon, J. Lim, Y. Kim, H. Seo, J. Chun, Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67 (2017) 1613–1617.
- [9] M. Johnson, I. Zaretskaya, Y. Raytselis, Y. Merezuk, S. McGinnis, T.L. Madden, NCBI BLAST: a better web interface, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) W5–W9.
- [10] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar, MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.* 30 (2013) 2725–2729.
- [11] W.E. Holben, P. Williams, M. Saarinen, L.K. Särkilahti, J.H. Apajalahti, Phylogenetic analysis of intestinal microflora indicates a novel *Mycoplasma* phylotype in farmed and wild salmon, *Microb. Ecol.* 44 (2002) 175–185.
- [12] R.G. Murray, E. Stackebrandt, Taxonomic note: implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described procaryotes, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 (1995) 186–187.
- [13] E. Stackebrandt, W. Frederiksen, G.M. Garrity, P.A.D. Grimont, P. Kämpfer, M.C.J. Maiden, X. Nesme, R. Rosselló-Mora, J. Swings, H.G. Trüper, L. Vauterin, A.C. Ward, W.B. Whitman, Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (2002) 1043–1047.
- [14] G.M. Garrity, A new genomics-driven taxonomy of *Bacteria* and *Archaea*: are we there yet? *J. Clin. Microbiol.* 54 (2016) 1956–1963.

5. Objetivos

5.1. Objetivos de los trabajos presentados

- Pérez-Sánchez T., Mora-Sánchez B., Balcázar J.L. 2018. Biological approaches for disease control in aquaculture: Advantages, limitations and challenges. *Trends in Microbiology* 26, 896-903.

El objetivo de este artículo fue realizar una actualización sobre las ventajas y desventajas de los métodos seguros utilizados en el control de las enfermedades presentes en los cultivos acuícolas, que contribuyera a la búsqueda de alternativas al uso de los antibióticos.

Consideramos importante antes de desarrollar cada uno de los estudios indagar sobre el uso seguro y económico de las estrategias biológicas que demostraran resultados prometedores para ser utilizadas como alternativas al uso de los antibióticos, así como también que pudieran ser evaluadas en el desarrollo de esta tesis.

- Mora-Sánchez B., Fuertes H., Balcázar J.L., Pérez-Sánchez T. 2020. Effect of a multi-citrus extract-based feed additive on the survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following challenge with *Lactococcus garvieae*. *Acta Veterinaria Scandinavica* 62, 38.

Los objetivos del estudio fueron, por un lado, evaluar la actividad antimicrobiana de un aditivo alimenticio elaborado a partir de extractos de múltiples cítricos (Biocitro®), frente a los siguientes agentes patógenos: *A. salmonicida*, *L. garvieae* y *Y. ruckeri* y, por otro lado, determinar la capacidad protectora frente a la infección causada por *L. garvieae* en cultivos de truchas arcoíris.

Para realizar este estudio se utilizó un método de dilución de caldo en el que se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de Biocitro® frente a los tres patógenos. Posteriormente, este compuesto fue administrado como un aditivo alimenticio en un cultivo de trucha arcoíris, con el fin de confirmar su efecto protector frente a *L. garvieae* en un desafío *in vivo*.

- Mora-Sánchez B., Balcázar J.L., Pérez-Sánchez T. 2020. Effect of a novel postbiotic containing lactic acid bacteria on the intestinal microbiota and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biotechnology Letters*.

Este estudio tuvo como objetivos evaluar el efecto de un nuevo postbiótico sobre la composición de la comunidad bacteriana dentro del ecosistema intestinal y la capacidad protectora frente a *L. garvieae* en un cultivo de trucha arcoíris.

Para ello, se diseñó un postbiótico obtenido de una bacteria ácido láctica del género *Lactobacillus* aislada de la microbiota intestinal de trucha arcoíris, que se mezcló con pienso comercial para administrarlo a los peces, con el fin de determinar los posibles cambios provocados en la composición de la microbiota y su efecto protector, mediante una infección experimental con *L. garvieae*.

- Pérez-Sánchez T., Mora-Sánchez B., Vargas A., Balcázar J.L. 2020. Changes in intestinal microbiota and disease resistance following dietary postbiotic supplementation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Microbial Pathogenesis* 142, 104060.

Los objetivos propuestos para este estudio fueron profundizar si la suplementación dietética de un postbiótico obtenido como un producto alimenticio fermentado de dos bacterias ácido lácticas podría inducir cambios en la microbiota intestinal y prevenir el desarrollo de la infección causada por *L. garvieae* en trucha arcoíris.

El postbiótico utilizado fue obtenido de dos bacterias ácido lácticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, y se administró incorporado en el pienso para alimentar a trucha arcoíris. Después del periodo de alimentación establecido para evaluar el posible efecto preventivo, se realizó un desafío *in vivo* frente a *L. garvieae*. Los peces que habían recibido la dieta con el postbiótico presentaron una mayor supervivencia frente al patógeno y se observaron cambios beneficiosos en la composición de la microbiota intestinal.

- Mora-Sánchez B., Pérez-Sánchez T., Balcázar J.L. 2020. Phylogenetic analysis of intestinal microbiota reveals novel *Mycoplasma* phylotypes in salmonid species. *Microbial Pathogenesis* 145, 104210.

Este estudio tuvo como objetivo describir la composición de la comunidad bacteriana dentro del ecosistema intestinal de especies de salmónidos: trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*), mediante un análisis filogenético de la microbiota intestinal de estos peces.

Para desarrollar este estudio fueron seleccionados dos especies de salmónidos, salmón real cultivados en Nueva Zelanda y trucha arcoíris cultivadas procedentes de Turquía y España, a las que se les realizó un análisis filogenético que demostró diferencia en la composición de la comunidad bacteriana dentro del ecosistema intestinal entre las especies, de acuerdo a su lugar de origen.

6. Metodología

Sin lugar a dudas, existen numerosos estudios que sugieren que el uso de alternativas naturales podría ser la terapia del futuro, por todos los aportes beneficiosos que han demostrado en el control de enfermedades bacterianas en los cultivos acuícolas con diferentes especies.

Una primera fase experimental bajo condiciones *in vitro* fue llevada a cabo en el Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad de Zaragoza, en el cual el compuesto natural a base de cítricos (Biocitro®) fue estudiado con la finalidad de evaluar su efecto inhibitorio frente al patógeno *L. garvieae*.

En la segunda etapa bajo condiciones *in vivo* se evaluó la capacidad inhibitoria del producto comercial Biocitro®, así como también, la de un postbiótico obtenido de una cepa ácido láctica *L. plantarum* y una mezcla postbiótica obtenida de dos bacterias ácido lácticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, frente al patógeno *L. garvieae* en cultivo de trucha arcoíris. Los estudios *in vivo* fueron realizados en la piscifactoría experimental de la Universidad de Zaragoza.

En el siguiente apartado se detalla la metodología utilizada para evaluar cada una de las alternativas al uso de antibióticos que consideramos prometedoras.

6.1. Aspectos generales de los procedimientos

6.1.1. Obtención y traslado de los peces

Todos los peces fueron obtenidos de una piscifactoría que forma parte de la Agrupación de Defensa Sanitaria Ganadera (ADSG) Acuícola de Aragón, concretamente de la explotación Viveros del Soto del Oliván (Huesca), dedicada al cultivo de esta especie.

Los ejemplares fueron trasladados a las instalaciones de la Universidad de Zaragoza, utilizando recipientes con capacidad de aproximadamente 50 litros de agua, que fue tomada de la misma piscifactoría. Durante su traslado sé aseguro principalmente que los animales contaran con suficiente suministro de oxígeno disuelto para su supervivencia, permitiendo que los peces llegaran en condiciones

adecuadas hasta la piscifactoría experimental de la Facultad de Veterinaria. Una vez allí, fueron colocados en tres tanques, con capacidad aproximada de 650 litros de agua sometidos a circuito de recirculación y refrigeración. Todos los peces se mantuvieron en agua dulce aireada con un recambio del 25% diario.

6.1.2. Grupos de peces

Para asignar los grupos de peces, 100 truchas fueron distribuidas al azar en tres grupos de la siguiente manera, en un primer tanque se colocaron 40 peces como grupo tratado, en un segundo grupo se colocaron de igual manera otros 40 animales destinados para grupo control, y en un tercer tanque se colocaron solamente 20 peces que fueron utilizados para llevar a cabo la infección con el patógeno. Este procedimiento fue realizado para las experiencias con el Biocitro® y un nuevo postbiótico. Sin embargo, para la experiencia de la combinación de dos postbióticos, se seleccionaron un total de 160 truchas arcoíris, asignadas de la siguiente manera. En un primer tanque se colocaron 70 peces seleccionados como grupo tratado, en un segundo grupo se colocaron 20 que fueron utilizados para la infección experimental y un tercer grupo en el que se colocaron 70 peces más destinados a grupo control.

6.1.3. Medición de peso inicial

Para la distribución de los peces en los grupos de estudio, éstos fueron previamente anestesiados con metanosulfonato de tricaína (Tricaine Pharmaq 1000 mg/g), con el fin de poder determinar el peso individual de los animales en cada uno de los tanques y establecer así el peso promedio inicial. De esta manera se pudo calcular la cantidad de alimento que deberían ingerir diariamente en función de su biomasa.

6.1.4. Aclimatación y desinfección

Consideramos importante que antes de iniciar cada una de las experiencias era necesario realizar un periodo de aclimatación durante dos semanas, en el cual los peces fueron alimentados con pienso comercial sin ningún aditivo. De igual manera, se realizaron fotoperiodos de doce horas durante todo el estudio.

Para tener una certeza de que los peces que serían utilizados para este estudio estuvieran libres de infestación producida por ectoparásitos, después de la primera semana se realizó un baño con Aquacen formaldehído a una concentración de 380 mg/l de acuerdo con las recomendaciones sugeridas por el fabricante. Durante este procedimiento se cerró el circuito del agua en cada uno de los tanques durante los 20 minutos que duró el tratamiento. Después del tiempo establecido para que los peces estuvieran en contacto con el producto antiparasitario, nuevamente se abrió el circuito de agua para eliminar el contenido del químico presente en los tanques. Estos baños preventivos fueron realizados dos veces con un intervalo de tres días, limitando así la presencia de ectoparásitos en los peces.

6.1.5. Parámetros físicos y químicos del agua

La determinación de los parámetros físicos del agua, tales como la temperatura y el oxígeno disuelto (mg/l) fueron medidos diariamente en cada uno de los tanques. Así mismo, semanalmente se tomaron muestras de agua de cada tanque (tratamiento, control y el destinado para la infección), para determinar los siguientes parámetros: nitritos, nitratos y amonio, con el objetivo de evaluar las condiciones experimentales en las que se desarrolló el estudio.

6.1.6. Bacteria patógena

Para esta etapa *in vivo*, las tres diferentes dietas fueron enfrentadas al mismo patógeno, *L. garvieae* CLFP 33 aislada de un brote en una piscifactoría del norte de España por nuestro grupo de investigación.

Para el cultivo del patógeno se utilizó una placa de TSA que fue incubada a una temperatura de 22 °C durante 24 horas. Una vez obtenido el crecimiento bacteriano se realizó la preparación de una suspensión homogénea, tomando una cantidad mínima de la bacteria, que fue leída mediante un espectrofotómetro a una densidad óptica de 600 nm, para obtener una concentración inicial de 10^7 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). A partir de esta concentración se realizaron diluciones seriadas en tubos que contenían 9 ml de solución salina estéril, obteniendo una concentración final de 10^4 (UFC/ml) que fue utilizada para las infecciones.

6.1.7. Infección con el patógeno

Después del periodo establecido de alimentación con cada uno de los productos a evaluar, se realizó el enfrentamiento de los peces con el patógeno en estudio. Se infectaron las truchas que habían sido mantenidas en un tanque diferente al resto de los grupos (tratado y control) establecidos para este procedimiento. La infección se realizó por vía intraperitoneal, para lo cual, se anestesió previamente a los peces con metanosulfonato de tricaína (Tricaine Pharmaq 1000 mg/g), y posteriormente se inocularon 0,1 ml de la suspensión del patógeno a una concentración final de 10^4 UFC/ml. Los peces inoculados fueron marcados mediante un corte en la aleta adiposa para establecer una infección por cohabitación en los grupos a evaluar.

6.1.8. Etapa *in vivo*

Una vez realizada la infección con el patógeno, todos los peces fueron supervisados tres veces al día, con el objetivo de observar cambios en la sintomatología desarrollada tales como: letargia, exoftalmia, hemorragias en la piel o globos oculares, natación errática, que indicarían que los peces estaban desarrollando los síntomas característicos de una infección por lactococosis provocando la muerte en los peces y determinar así el porcentaje de supervivencia. Las truchas muertas fueron pesadas de manera individual, para evaluar el efecto de cada una de las dietas en el crecimiento. De igual manera, se retiraron de inmediato para realizar la necropsia y evidenciar el daño causado por el patógeno a nivel de órganos en los peces que presentaban la sintomatología compatible con lactococosis.

6.1.9. Número de peces sacrificados

Los peces fueron sacrificados en dos momentos diferentes durante el estudio: Antes de ser infectados con el patógeno y al final de cada una de las experiencias. En cada uno de los momentos se extrajo contenido (mucus) y tejido de la mucosa intestinal. Para obtener la muestra se sacrificaron cinco peces por grupo experimental (control y tratado) en la experiencia para el estudio Biocitro® y un nuevo postbiótico. Sin embargo, en el estudio de la combinación de dos postbióticos se seleccionaron solamente cuatro peces de cada grupo experimental (control y tratado).

6.1.10. Eutanasia

La eutanasia se realizó aplicando una sobredosis letal del anestésico metanosulfonato de tricaina (Tricaine Pharmaq 1000 mg/g), en cada recipiente que contenía a los peces de los grupos experimentales (tratado y control). Confirmada la muerte, se procedió a la necropsia haciendo uso de la técnica de disección aséptica, evitando contaminar o dañar las muestras de tejidos y contenido intestinal (mucus). Este material se extrajo con una hoja de bisturí estéril y se depositó en viales estériles debidamente rotulados, que fueron guardados a una temperatura de - 80 °C hasta el momento de realizar la extracción del material genético.

Las muestras de los peces fueron extraídas con la finalidad de evaluar el efecto protector y la modificación causada en la composición de la microbiota por el fitobiótico, además de los cambios provocados por los postbióticos en la diversidad de la microbiota intestinal de los peces, por medio de un análisis con los datos obtenidos de la secuenciación masiva del gen 16S ARN ribosomal.

6.1.11. Extracción del ADN

Obtenida cada una de las muestras, éstas fueron debidamente rotuladas y guardadas en el Laboratorio de Ictiopatología a una temperatura de -80 °C, con la descripción del grupo al que pertenecía el pez.

El tejido de la parte distal del intestino de los peces fue homogenizado utilizando un *stomacher*. Para obtener una mejor lisis de la muestra, se tuvieron que realizar pequeñas modificaciones en el protocolo de extracción, aplicando lisozima a la muestra homogenizada antes de desarrollar el procedimiento de la extracción del ADN genómico mediante la utilización de un kit comercial, DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN; Valencia, CA, EE. UU.). Posteriormente, la concentración y pureza del material genético fue determinada usando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific; Wilmington, DE, EE. UU.).

6.1.12. Secuenciación

Las muestras de ADN genómico fueron enviadas a Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur) con el fin de secuenciar el gen 16S ARN ribosomal mediante la plataforma Illumina

Miseq (Illumina Inc., San Diego, CA, EE.UU.). El análisis de las secuencias se realizó utilizando el programa informático MOTHUR (<https://mothur.org/>). Las secuencias fueron inicialmente filtradas por calidad, y posteriormente, fueron alineadas y agrupadas para establecer unidades taxonómicas operativas (OTUs) con una similitud del 97%. Además, la taxonomía de algunos OTUs fue también establecida mediante un análisis comparativo con secuencias de especies de referencia en la base de datos EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>).

6.2. Evaluación de Biocitro®

6.2.1. Etapa *in vitro*

El uso de compuestos naturales derivados de plantas (fitobióticos) está siendo considerado como una buena herramienta alternativa de control a las enfermedades bacterianas. Por ello, se realizó una primera etapa *in vitro* con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana del compuesto comercial Biocitro® frente a diversos agentes infecciosos de interés en acuicultura continental.

Las bacterias patógenas *A. salmonicida* (cepa CLFP30), *L. garvieae* (cepa CLFP33) y *Y. ruckeri* (cepa C4R7), previamente aisladas de trucha arcoíris en brotes anteriores e identificadas por métodos microbiológicos, se cultivaron en placas de TSA durante la noche a 22 ± 2 °C. Posteriormente, las bacterias se recogieron y se resuspendieron en una solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 7,4).

Las suspensiones bacterianas fueron ajustadas espectrofotométricamente a una absorbancia (600 nm) de $0,125 \pm 0,05$, que correspondía a una concentración de 10^7 UFC/ml. Las diluciones seriadas de cada suspensión bacteriana se extendieron sobre placas duplicadas de TSA divididas en tres partes; en la primera se perforó el agar con la parte superior de un tubo estéril y se colocaron 100 µl del producto comercial (presentación viscosa); en la segunda parte se colocó un disco estéril impregnado con 10 µl del producto de la misma presentación y en la tercera parte de la placa se colocaron 0,05 gramos del producto comercial (presentación polvo). Después de un periodo de 24 h, se midieron los halos que presentaban para determinar la capacidad inhibitoria del compuesto Biocitro® frente al patógeno y se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC), para verificar la concentración del inóculo bacteriano.

6.2.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se usó un método de dilución de caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de Biocitro® frente a los tres patógenos. Se añadió un volumen de 1,0 ml de Biocitro® a tubos de ensayo estériles que contenían 1,0 ml de caldo de tripticasa de soja (TSB) y se diluyó en serie de dos para obtener concentraciones de 0,25 a 250 µg/ml. Posteriormente los tubos fueron inoculados con 1,0 ml de cultivo bacteriano a una concentración de 10⁵ UFC/ml. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado con su correspondiente control negativo (solo con medio de cultivo) y control positivo (con el antibiótico oxitetraciclina). Para verificar el crecimiento bacteriano se usaron tubos que contenían bacterias en TSB y para verificar la esterilidad durante el procedimiento se utilizaron tubos que contenían solo TSB.

6.2.3. Interpretación de la CMI

Después de 24h de incubación a 22±2 °C, se observó la turbidez de los tubos. La ausencia de turbidez se interpretó como ausencia de crecimiento, la presencia de turbidez se interpretó como crecimiento positivo correspondiente a la concentración más baja (µg/ml) de Biocitro® o antibiótico, que inhibía completamente el crecimiento visible de las tres especies bacterianas (*A. salmonicida*, *Y. ruckeri* y *L. garvieae*) en comparación con el control.

6.2.4. Dieta administrada

Para evaluar si el compuesto Biocitro® confería un efecto protector contra la infección bacteriana causada por *L. garvieae* en trucha arcoíris, los peces con una masa promedio de 25,0 ± 5,0 g fueron tratados con una dieta suplementada con este compuesto durante cuatro semanas y luego se realizó un desafío frente al patógeno en estudio.

Para iniciar con la alimentación de los peces con Biocitro®, se calculó una concentración de 750 mg/kg que fueron mezclados con 100 g de pienso. De esta dieta preparada de manera periódica cada semana y guardada a 4 °C, se tomó diariamente la cantidad que le correspondía al grupo tratado durante un periodo de 30 días. De igual manera el grupo control y grupo seleccionado para realizar la infección fueron

alimentados con un alimento comercial sin ningún aditivo. Todos los peces fueron alimentados diariamente al 1,5% de su biomasa.

6.3. Evaluación de un nuevo postbiótico

6.3.1. Obtención del postbiótico

El nuevo postbiótico se obtuvo como un alimento fermentado desarrollado en dos fases, tal y como se describe a continuación:

6.3.1.1. Primera fase

En esta fase se realizó el cultivo bacteriano obtenido de la cepa ácido láctica del género *Lactobacillus* (CECT 9882), mediante un proceso de fermentación, a partir de un cultivo de 24 h en medio de cultivo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) a 22 °C. Después del período de incubación, se realizó la segunda fase que se detalla en el siguiente apartado.

6.3.1.2. Segunda fase

Una vez obtenido el crecimiento de las cepas ácido lácticas, se procedió a realizar el proceso de fermentación sólida, homogenizando las células bacterianas con levadura de cerveza, harina de soja y alfalfa. Posteriormente este compuesto fue sometido a un proceso final de micronización para favorecer la mezcla con el pienso comercial.

6.3.2. Dieta administrada

A partir de este compuesto final se tomaron 3,0 mg/g del producto y se mezclaron con 100 g de pienso comercial. De esta preparación elaborada cada semana, se administró diariamente a los peces cuyo promedio de masa era de $24,6 \pm 5,1$ g la cantidad que le correspondía al grupo tratado durante 30 días al 1,5% de su biomasa.

6.4. Combinación de dos postbióticos

Al igual que la experiencia anterior, este postbiótico se obtuvo como alimento fermentado, el cual fue desarrollado en dos fases:

6.4.1. Obtención de la dieta experimental

6.4.1.1. Primera fase

Dos bacterias ácido lácticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, previamente cultivadas en medio MRS a 22 °C durante 24h, fueron añadidas en concentraciones similares. Posteriormente, se añadió levadura de cerveza para desarrollar el proceso de fermentación, utilizando como sustrato vegetal harina de soja y alfalfa. Tras esta fermentación sólida, el producto resultante fue micronizado, obteniendo un pienso complementario comercial (Pentaqua®).

6.4.1.2. Segunda fase

Posterior a la obtención del pienso complementario, se seleccionó una concentración de 3,0 mg/g que fue agregada por el fabricante (AQUASOJA) e incorporada a un pienso compuesto, para ser administrado diariamente de acuerdo a la cantidad que le correspondía al grupo de peces tratado con una masa promedio de $24,1 \pm 7,4$ g durante 30 días.

6.5. Análisis filogenético

6.5.1. Peces seleccionados

Para este estudio fueron seleccionados tres ejemplares de trucha arcoíris, cultivados en nuestras instalaciones, que fueron alimentados con un pienso comercial sin ningún aditivo. Los peces con un peso promedio de 40,0 g fueron sacrificados utilizando el procedimiento de eutanasia descrito previamente con el objetivo de obtener muestra de tejido intestinal. Así mismo, se realizó la extracción del ADN genómico mediante la utilización de un kit comercial *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN) y las muestras fueron enviadas a Macrogen Inc (Seúl, Corea del Sur), para realizar la secuenciación masiva del gen 16S ARN ribosomal en la plataforma Illumina Miseq.

6.5.2 Comparación filogenética

El análisis filogenético se realizó utilizando datos de estudios previos, cuyas secuencias están depositadas en la *Sequence Read Archive* (SRA) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI; Bethesda, MD, EE. UU.). Las secuencias

fueron obtenidas a partir de la microbiota intestinal de ejemplares de salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*) cultivados en Nueva Zelanda y trucha arcoíris cultivadas en Turquía, con la finalidad de comparar la presencia y abundancia de los filotipos bacterianos con aquellos de las truchas arcoíris cultivadas en nuestras instalaciones. Finalmente, los análisis comparativos se realizaron utilizando el programa informático MOTHUR (<https://mothur.org/>).

7. Discusión general

A causa de las limitaciones establecidas al uso de antibióticos en la producción acuícola, muchos investigadores han decidido reconducir sus líneas de investigación a la búsqueda de herramientas biológicas prometedoras y seguras para el control de enfermedades infecciosas.

La recopilación de información en nuestro artículo de revisión representa un aporte al uso de herramientas biológicas (fitobióticos, probióticos, postbióticos, entre otros) utilizadas en el control de agentes patógenos. Los resultados satisfactorios obtenidos por diferentes autores que han hecho uso de estas herramientas demuestran que pueden ser consideradas estrategias prometedoras en el control de infecciones en acuicultura (Defoirdt *et al.*, 2011; Pérez-Sánchez *et al.*, 2018).

Algunas de estas alternativas detalladas en nuestro artículo de revisión aún se encuentran en fase de investigación, y aunque la mayoría de ellas han presentado resultados positivos en condiciones *in vitro*, es necesario que sean evaluadas en campo para ampliar el conocimiento sobre cada una de ellas, considerando sus ventajas y desventajas en su mecanismo de acción, al igual que sus efectos secundarios sobre el hospedador.

La recopilación de información también nos permitió considerar la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de control, permitiendo de esta manera compartir los resultados, y que al mismo tiempo puedan ofrecer una opción de protección a los peces frente a infecciones causadas por patógenos.

El uso de compuestos naturales derivados de plantas (fitobióticos) ha demostrado ser una opción a la aplicación de antibióticos en el control de enfermedades bacterianas. El primer estudio experimental nos permitió evaluar la actividad antimicrobiana del compuesto natural Biocitro® frente a *L. garvieae*, *Y. ruckeri* y *A. salmonicida*. Para ello, se realizó una etapa *in vitro* en la que los resultados obtenidos fueron comparados con el antibiótico de referencia oxitetraciclina, observando que este último inhibió el crecimiento de *A. salmonicida* a una concentración de 3,9 µg/ml y para *L. garvieae* y *Y. ruckeri* a una concentración 7,8 µg/ml. Estudios previos han presentado resultados similares en cepas patógenas aisladas de cultivos de peces,

camarones y muestras ambientales (agua y sedimento) (Schmidt *et al.*, 2000; Rodgers *et al.*, 2001). No obstante, cuando se evaluó la CMI del compuesto, los resultados revelaron que 2,0 µg/ml de Biocitro® eran suficientes para inhibir el crecimiento de las tres cepas patógenas enfrentadas. Existen estudios que demuestran que el uso de extractos de cítricos tiene la capacidad de inhibir la presencia de levaduras tales como (*Saccharomyces bayanus*, *Pichia mambrenifaciens* y *Rhodotorula bacarum*) y de bacterias (*Brachyspira hyodysenteriae*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* y *Bacillus coagulans*), respaldando de esta manera nuestros resultados (de Nova *et al.*, 2017; Bevilacqua *et al.*, 2010).

Los resultados prometedores obtenidos en esta primera etapa (*in vitro*) nos permitieron evaluar la capacidad que el compuesto Biocitro® podría conferir a los peces tratados en un enfrentamiento *in vivo* con *L. garvieae*. Para ello, se seleccionó un grupo de 40 truchas arcoíris a las que se le administró una dieta con el compuesto natural, para las que se obtuvo un porcentaje de supervivencia del 72%, significativamente mayor que lo observado en el grupo control. Un resultado similar fue descrito en un estudio con un fitobiótico comercial (Digestarom®), considerado por algunos autores como modulador de la respuesta inmune e inductor de cambios en la microbiota intestinal de los peces (Giannenas *et al.*, 2012), ya que posee efectos antimicrobianos conferidos por sus compuestos que incluye anetol, carvacrol, limoneno y timol, los que han demostrado un efecto protector frente a infecciones bacterianas causadas por *A. salmonicida* en trucha arcoíris (Menanteau-Ledouble *et al.*, 2015). Otros investigadores han documentado la reducción de la mortalidad en especies de bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) tratadas con Digestarom® y enfrentadas a *Edwardsiella ictaluri* (Peterson *et al.*, 2018). El efecto antimicrobiano de los extractos de plantas también se ha estudiado por otros investigadores, como es el caso de Torrecillas *et al.* (2019), quienes utilizaron una dieta que contenía PHYTO®, un compuesto elaborado a base de ajo (*Allium sativum*) y lamiáceas (*Lamiaceae*), y que fue administrada a los peces por un periodo de 63 días en los que se demostró su capacidad inhibitoria frente al patógeno *V. anguillarum*.

Con el objetivo de encontrar alternativas que puedan ser usadas de manera segura en infecciones causadas por *L. garvieae* en cultivos de trucha arcoíris, un estudio

experimental fue realizado con un postbiótico obtenido de una cepa del género *Lactobacillus*, cuyos resultados nos permiten considerar el uso de postbióticos como una estrategia prometedora, principalmente porque se podría evitar el riesgo de administrar microorganismos vivos. Observamos que la dieta suplementada con el postbiótico modificó la composición de la comunidad bacteriana de los peces, lo que puede representar una alternativa para prevenir y controlar trastornos patológicos y fisiológicos en los peces (Pérez *et al.*, 2010). Al realizar el análisis bioinformático de los datos obtenidos por secuenciación masiva observamos la presencia del filo Tenericutes clasificadas como perteneciente al género *Mycoplasma* y en menor proporción las Spirochaetes y Bacteroidetes en peces tratados. Ciric *et al.* (2019) demostraron en sus investigaciones que la presencia del patógeno, en este caso *Vibrio*, se correlacionaba inversamente con la presencia de *Mycoplasma* en la microbiota intestinal de salmón real. Otro estudio también demostró que el género *Mycoplasma* fue el taxón dominante encontrado en la microbiota intestinal de líneas resistentes de trucha arcoíris (Brown *et al.*, 2019). Estos estudios nos permiten asociar la suplementación de una dietética postbiótica a los peces tratados con el aumento de la presencia de este tipo de bacterias. Sin embargo, la información que se tiene sobre *Mycoplasma* y su efecto en la microbiota intestinal de peces es muy limitada, remarcando la necesidad de realizar más investigaciones que demuestren la capacidad de este género involucrado en la prevención de las infecciones bacterianas.

Los resultados obtenidos en nuestros trabajos y los hallazgos previos marcan un desafío sobre el conocimiento del uso de postbióticos como suplemento dietético, el cual puede representar una alternativa segura en la prevención y/o control de infecciones por bacterias.

Tras la experiencia favorable con el postbiótico obtenido con una única bacteria, se evaluó un postbiótico obtenido de dos bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. Nuestros hallazgos demostraron que al realizar el análisis de secuenciación masiva de la microbiota intestinal de los peces tratados con postbióticos no se encontró presente el género *Desulfovibrio desulfuricans* causante de infecciones en humanos (Hagiya *et al.*, 2018), lo cual es un hecho relevante puesto que secuencias afiliadas a este género sí que fueron dominantes en el grupo control. El análisis de

secuenciación a partir de las muestras intestinales también reveló que las unidades taxonómicas operativas (OTUs) fueron clasificadas como bacterias de los géneros *Enhydrobacter*, *Paracoccus* y *Pseudomonas*. Cabe mencionar que, en estudios realizados por otros investigadores, estas bacterias han revelado capacidad antimicrobiana (Gram *et al.*, 1999; Wanka *et al.*, 2018). Además, en los peces alimentados con el postbiótico, se encontraron bacterias del filo Actinobacteria y Firmicutes, este último representado por el género *Lactobacillus*, lo que sugiere que el postbiótico, a diferencia de un probiótico no incorpora bacterias vivas, puede aumentar la presencia de bacterias de este género que, a su vez, producen efectos beneficiosos como el incremento en la microbiota intestinal saludable, inhibición de agentes patógenos y una mejor respuesta inmune en el hospedador (Vendrell *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2017).

El uso de la tecnología de secuenciación de alto rendimiento del gen 16S rRNA ha permitido a muchos investigadores descubrir nuevas especies bacterianas, así como conocimientos importantes sobre la composición de la comunidad bacteriana. Como parte del desarrollo de esta tesis, el uso de esta tecnología nos permitió explorar la composición de la comunidad bacteriana del ecosistema intestinal de peces salmónidos. Los resultados obtenidos demostraron que el filo Tenericutes fue abundante en la muestra de todos los peces estudiados, independientemente de su origen, ya que muchas secuencias fueron asignadas a la familia *Mycoplasmataceae*. Sin embargo, estas bacterias no se habían descrito en peces salmónidos. El análisis comparativo de las secuencias encontradas en nuestro estudio con aquellas secuencias depositadas en las bases de datos de GenBank, EMBL y DDBJ, revelaron que estas secuencias representadas por el OTU1 y OTU2, estaban estrechamente relacionadas con clones bacterianos no cultivables.

El análisis también demostró que la secuencia de nucleótidos perteneciente al OTU1 solamente fue dominante en muestras de truchas cultivadas en piscifactoría experimental de España y no en muestras de peces de Turquía y Nueva Zelanda. Al mismo tiempo pudimos determinar que los análisis filogenéticos del OTU1 estaban estrechamente relacionados (99,62%) con clones bacterianos no cultivables, principalmente el clon BHJA identificado con el número de acceso de GenBank

AY065998 que fue aislado de salmón atlántico (*Salmon salar*) cultivado en piscifactoría y salmón salvaje procedente de Noruega y Escocia (Holben *et al.*, 2002). Las secuencias encontradas en el OTU2 fueron dominantes en todos los peces del estudio y relacionadas con clones aislados de diferentes partes del mundo, principalmente con el clon P2C8 con número de GenBank MN833643, reflejando un 99,65% de similitud.

El análisis de los OTUs demostró que los clones deberían ser incluidos como nueva especie dentro del género *Mycoplasma*, pero lamentablemente no cumple con las normas mínimas para ser descrita como tal, ya que el clon BHJA en la secuencia del gen 16S rRNA de OTU1, solo tiene 400 pb de longitud y el *ad hoc committee* establece que se requiere una secuencia de al menos 1300 pb del 16S rRNA para la reevaluación de especie en bacteriología (Stackebrandt *et al.*, 2002; Garrity *et al.*, 2016). No obstante, el análisis filogenético del OTU2, específicamente (clon P2C8) justifica la importancia de una propuesta taxonómica de acuerdo con las directrices, el cual podría ser asignado como una nueva especie "*Candidatus*" dentro del género *Mycoplasma* con el nombre *Mycoplasma tructae* (*tractae* L. gen *tractae* de trucha). La descripción de este nuevo "*Candidatus*" fue determinada por secuencias asignadas al OTU1, cuyo número de identificación en las bases de GenBan/EMBL/DDBJ queda registrado bajo la secuencia del gen 16S rRNA *Mycoplasma tructae* MN833643 detectada en especie de salmónidos. Un estudio reciente demostró que las secuencias pertenecientes a especies de *Mycoplasma* no clasificadas fueron más abundantes en la microbiota de líneas resistentes a *Flavobacterium psychrophilum* de trucha arcoíris que en aquellas encontradas en las líneas susceptibles (Brown *et al.*, 2019).

Es evidente la necesidad de contar con más estudios para evaluar las posibles implicaciones en el estado de salud de los peces, ya que, la estructura y composición de la microbiota intestinal está influenciada por su entorno, en el que diversas especies microbianas compiten entre sí por el espacio, los nutrientes y la energía disponible. Para esto se deben aislar cepas del género *Mycoplasma* e identificar las especies que pertenecen a la microbiota intestinal, determinar la función que ejercen y al mismo tiempo poder conocer las posibles manifestaciones clínicas que puedan causar sobre la salud del huésped.

8. Conclusiones / Conclusions

Conclusiones

- PRIMERA: La aplicación de un fitobiótico como el Biocitro® se considera un producto a tener en cuenta para prevenir la lactococosis de la trucha arcoíris.
- SEGUNDA: La manipulación de la microbiota intestinal de los peces mediante la administración de postbióticos ha permitido un mayor grado de protección frente a *Lactococcus garvieae*.
- TERCERA: La administración de una dieta postbiótica simple (una cepa) o mixta (dos cepas) se muestra como una alternativa útil en el control de la lactococosis.
- CUARTA: La microbiota intestinal de los peces constituye un reservorio de nuevas especies del género *Mycoplasma* que requieren una descripción taxonómica y funcional.
- QUINTA: La aplicación de postbióticos y fitobióticos se muestra como una buena herramienta preventiva para el control de enfermedades de etiología bacteriana como la lactococosis de la trucha.

Conclusions

- FIRST: The application of a phytobiotic such as Biocitro® is claimed as a product to be considered to prevent lactococcosis in rainbow trout.
- SECOND: The manipulation of the intestinal microbiota of fish through the administration of postbiotics has allowed a greater degree of protection against *Lactococcus garvieae*.
- THIRD: Dietary administration of single (one strain) or mixed (two strains) postbiotics is regarded as a useful alternative to control lactococcosis.
- FOURTH: The intestinal microbiota of fish represents a reservoir of novel species of the genus *Mycoplasma* that require a taxonomic and functional description.
- FIFTH: The application of postbiotics and phytobiotics is regarded as a useful preventive measure to control bacterial diseases such as lactococcosis in rainbow trout.

9. Bibliografía

Abdel-Tawwab M., Abbass F.E. Turmeric powder, *Curcuma longa L.*, in common carp, *Cyprinus carpio L.*, diets: growth performance, innate immunity, and challenge against pathogenic *Aeromonas hydrophila* infection. *Journal of the World Aquaculture Society*. 2017; 48: 303–312.

Adebolu T.T., Oladimeji S.A. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Ocimum gratissimum* on selected diarrhea causing bacteria in southwestern Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 2005; 4: 682–684.

Adel M., Lazado C.C., Safari R., Yeganeh S., Zorriehzadra MJ. Aqualase®, a yeast-based in-feed probiotic, modulates intestinal microbiota, immunity and growth of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Research*. 2017; 48: 1815–1826.

Aguilar-Toalá J.E., Garcia-Varela R., Garcia H.S., Mata-Haro V., González-Córdova A., Vallejo-Córdova B., Hernández-Mendoza A. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science Technology*. 2018; 75: 105–114.

Ahmed H.H., Abdel-Rahman M., Salem F.H., Shalby A.B., Lokman M.S. Antitumor efficacy of *Boswellia serrata* extract in management of colon cancer induced in experimental animal. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013; 5: 379–389.

Akinbowale O.L., Peng H., Barton M.D. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*. 2007; 103: 2016–2025.

Ali N., Ahmed G., Ali S., Shah I., Ghias M., Khan I. Acute toxicity, brine shrimp cytotoxicity and relaxant activity of fruits of *Callistemon citrinus* curtis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2011; 11: 99.

Allen H.K. Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals. *Current Opinion in Microbiology*. 2014; 19: 25–29.

Aly S.M, Ahmed Y.A, Ghareeb A.A, Mohamed M.F. 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 and Shellfish Immunology*. 2008; 25: 128–136.

Ang C.Y., Sano M., Dan S., Leelakriangsak M., Lal T.M. Postbiotics applications as infectious disease control agent in aquaculture. *Biocontrol Science*. 2020; 25: 1–7.

APROMAR (Asociación Empresarial de Acuicultura de España). La Acuicultura en España. 2019; 91 pp.

Austin B., Stuckey L., Robertson P., Effendi I., Griffith D. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases*. 1995; 18: 93–96.

Azemi M.E., Namjoyan F., Khodayar M. J., Ahmadpour F., Padok A. D., Panahi M. The antioxidant capacity and anti-diabetic effect of *Boswellia serrata* triana and planch aqueous extract in fertile female diabetic rats and the possible effects on reproduction and histological changes in the liver and kidneys. *Jundishapur Journal Natural Pharmaceutical Product*. 2012; 7: 168.

Baba S., Osakabe N., Natsume M., Yasuda A., Muto Y., Hiyoshi T., Takano H., Yositawa T., Terao J. Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans. *European Journal Nutrition*. 2005; 44: 1–9.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 446–475.

Balcázar J.L., De Blas I., Zarzuela-Ruiz I., Cunningham D., Vendrell D., Múzquiz J.L. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*. 2006; 114: 173–186.

Balcázar J.L., De Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Vendrell D., Calvo A., C, Márquez I., Girones O., Múzquiz J.L. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following

probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition*. 2007; 97: 522–527.

Bercovier H., Ghittino C., Eldar A. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. *Developments in Biological Standardization*. 1997; 90: 153.

Bevilacqua A., Corbo M.R., Sinigaglia M. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of eugenol, limonene, and citrus extract against bacteria and yeasts, representative of the spoiling microflora of fruit juices. *Journal Food Protection*. 2010; 73: 888–894.

Border M., Hashim R., Manaf M.S., Nor S.A.M. Dietary prebiotics and probiotics influence the growth performance, feed utilization, and body indices of snakehead (*Channa striata*) fingerlings. *Tropical Life Sciences Research*. 2016; 27: 111.

Brenes A., Roura E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*. 2010; 158: 1–14.

Brown R.M., Wiens G.D., Salinas I. Analysis of the gut and gill microbiome of resistant and susceptible lines of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*. 2019; 86: 497–506.

Brunt J., Austin B. Usestiles of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*. 2005; 28: 693–701.

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004; 94: 223–253.

Cabello F.C., Godfrey H.P., Tomova A., Ivanova L., Dölz H., Millanao A., Buschmann A.H. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environment Microbiology*. 2013; 15: 1917–1942.

Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt

tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002; 46: 1914–1920.

Castro-Osses D., Carrera-Naipil C., Gallardo-Escárate C., Gonçalves A.T. Functional diets modulate the acute phase protein response in *Oncorhynchus mykiss* subjected to chronic stress and challenged with *Vibrio anguillarum*. *Fish and Shellfish Immunology*. 2017; 66: 62–70.

Cheng W., Liu C.H., Chen J.C. Effect of nitrite on interaction between the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its pathogen *Lactococcus garvieae*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2002; 50: 189–197.

Choe D.W., Foo H.L., Loh T. C., Hair-Bejo M., Awis Q. S. Inhibitory property of metabolite combinations produced from *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Tropical Agriculture Science*. 2013; 36: 79–88.

Chythanya R., Karunasagar I., Karunasagar I. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture*. 2002; 208: 1–10.

Cicenia A., Scirocco A., Carabotti M., Pallotta L., Marignani M., Severi C. Postbiotic activities of lactobacilli-derived factors. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2014; 48: 18–22.

Cicenia A., Santangelo F., Gambardella L., Pallotta L., Lebba V., Scirocco A., Marignani M., Tellan G., Carabotti M., Stefano C., Serena S., Severi C. Protective role of postbiotic mediators secreted by *Lactobacillus rhamnosus* GG versus Lipopolysaccharide-induced damage in human colonic smooth muscle cells. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2016; 50: 140–144.

Cintas M., Casaus p., Herranz C., Havarstein S., Holo H., Hernandez H., Nes F. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin. *Journal of Bacteriology*. 2000; 182: 6806–6814.

Ciric M., Waite D., Draper J., Jones J.B. Characterization of mid-intestinal microbiota of farmed Chinook salmon using 16S rRNA gene metabarcoding. *Archives of Biological Sciences*. 2019; 71: 577–587.

Citarasu T., Babu M.M., Sekar R.J., Petermarian M. Developing Artemia enriched herbal diet for producing quality larvae in *Penaeis monodo*, Fabricius. *Asian Fisheries Science* 2002; 15: 21–32.

Collado M., Meriluoto J., Salminen S. Roles of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*. 2007; 45: 454–460.

Collins M.D., Farrow J.A., Phillips B.A., Kandler. O. *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. *Journal of General Microbiology*. 1983; 129: 3427–3431.

Dabrowski K., Lee K.J., Guz L., Verlhac V., Gabaudan J. Effects of dietary ascorbic acid on oxygen stress (hypoxia or hyperoxia), growth and tissue vitamin concentrations in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2004; 233: 383–392.

Defoirdt T., Sorgeloos P., Bossier. P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*. 2011; 14: 251–258.

de Nova P.J., Carvajal A., Prieto M., Rubio. P. *In vitro* susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* to a commercial citrus fruit extract. *Research in Veterinary Science*. 2017; 115: 318–324.

Doménech A., Prieta J., Fernández-Garayzábal J.F., Collins M.D., Jones D., Dominguez L. Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus seriolicida*. *Microbiología. Madrid Spain*. 1993; 9: 63–68.

Dunand E., Burns P., Binetti A., Bergamini C., Peralta G., Forzani L., Reinheimer J., Vinderola. G. Postbiotics produced at laboratory and industrial level as potential functional food ingredients with the capacity to protect mice against *Salmonella* infection. *Journal of Applied Microbiology*. 2019; 127: 219–229.

EFSA (European Food Safety Authority). Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*. 2012; 10: 2740.

Egervärn M.; Roos S., Lindmark H. Identification and characterization of antibiotic resistance genes in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*. 2009; 107: 1658–1668.

Eldar A., Ghittino C., Asanta L., Bozzetta E., Goria M., Prearo M., Bercovier H. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Current Microbiology*. 1996; 32: 85–88.

Facklam R., Elliott J. A. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive coccus, excluding the streptococcus and enterococcus. *Clinical Microbiology Review*. 1995; 8: 479–495.

Falagas M.E., Makris G.C., Matthaiou D.K., Rafailidis P.I. Statins for infection and sepsis: a systematic review of the clinical evidence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008; 61: 774–785.

FAO (Food and Agriculture Organization). The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome, Italy. 2018; 227 pp.

FAO (Food and Agriculture Organization). The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020. Supporting the food and agriculture sectors in implementing the Global Action Plan on Antimicrobial Resistance to minimize the impact of antimicrobial resistance. Rome, Italy. 2016; 18 pp.

FAO (Food and Agriculture Organization). The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome, Italy. 2010; 197 pp.

FAO (Food and Agriculture Organization). The State of Food and Agriculture. Rome, Italy. 2009; 166 pp.

FAO (Food and Agriculture Organization). Responsible use of antibiotics in aquaculture. Fisheries Technical Paper 469. 2005; 98 pp.

FAO/WHO. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina. 2001; 56 pp.

Fihman V., Raskine L., Barrou Z., Kiffel C., Riahi J., Berçot B., Sanson-Le Pors M.J. *Lactococcus garvieae* endocarditis: identification by 16S rRNA and sodA sequence analysis. *Journal of Infection*. 2006; 52: 3–6.

Garriques D., Arevalo G. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* post-larvae in Ecuador. In: Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture 95 (eds C.L. Browdy, and J.S. Hopkins), World Aquaculture Society, Baton Rouge. 1995; pp. 53–59.

Garrity G.M. A new genomics-driven taxonomy of Bacteria and Archaea: are we there yet? *Journal of Clinical Microbiology*. 2016; 54: 1956–1963.

Garvie E., Farrow J., Phillips B.A. A taxonomic study of some strains of streptococci which grow at 10 °C but not at 45 °C including *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *Central Journal for Bacteriology, Microbiology and Hygiene*. 1981; 2: 151–165.

Gatesoupe F.J. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*. 1991; 96: 335–342.

Ghittino C., Múzquiz J.L. La estreptococosis de la trucha arco iris en España. Reunión de Piscicultores, Zaragoza. *Revista Aquatic*. 1998; 2.

Ghittino C. La estreptococosis en los peces. *Revista Aquatic*. 1999; 6.

Giannenas I., Triantafillou E., Stavrakakis S., Margaroni M., Mavridis S., Steiner T., Karagouni E. Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2012; 350: 26–32.

Gibello A., Galán-Sánchez F., Blanco M., Rodríguez-Iglesias M., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F. The zoonotic potential of *Lactococcus garvieae*: An overview on microbiology, epidemiology, virulence factors and relationship with its presence in foods. *Research in Veterinary Science*. 2016; 109: 59–70.

Gibson L.F., Woodworth J., George A.M. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture*. 1998; 169: 111–120.

Goda A.M., Omar E.A., Srour T.M., Kotiet A.M., El-Haroun E., Davies S.J. Effect of diets supplemented with feed additives on growth, feed utilization, survival, body composition and intestinal bacterial load of early weaning European seabass, *Dicentrarchus labrax* post-larvae. *Aquaculture International*. 2018; 26: 169–183.

Gram L., Melchiorson J., Spanggaard B., Huber I., Nielsen T.F. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology*. 199; 65: 969–973.

Hagiya H., Kimura K., Nishi I., Yamamoto N., Yoshida H., Akeda Y., Tomono K. *Desulfovibrio desulfuricans* bacteremia: a case report and literature review. *Anaerobe*. 2018; 49: 112–115.

Hazzit M., Baaliouamer A., Faleiro M.L., Miguel M.G. Composition of the essential oils of thymus and organum species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54: 6314–6321.

Heppell J., Davis H.L. Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2000; 43: 29–43.

Heuer O.E., Grave K., Collignon P., Karunasagar I., Angulo F.J. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases*. 2009; 49: 1248–1253.

Holben W.E., Williams P., Saarinen M., Särkilahti L.K., Apajalahti J.H. Phylogenetic analysis of intestinal microflora indicates a novel *Mycoplasma* phylotype in farmed and wild salmon. *Microbial Ecology*. 2002; 44: 175–185.

Isolauri E., Sütas Y., Kankaanpää P., Arvilommi H., Salminen. S. Probiotic effects on immunity. *The American Journal of Clínica Nutrition*. 2001; 73: 444–450.

Jöborn A., Olsson J.C., Westerdahl A., Conway P.L., Kjelleberg S. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. *Journal of Fish Diseases*. 1997; 20: 383–392.

Kareem Z.H., Abdelhadi Y.M., Christianus A., Karim M., Romano N. Effects of some dietary crude plant extracts on the growth and gonadal maturity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and their resistance to *Streptococcus agalactiae* infection. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2016; 42: 757–769.

Kareem K.Y., Loh T.C., Foo H.L., Asmara S.A., Akit. H. Influence of postbiotic RG14 and inulin combination on cecal microbiota, organic acid concentration, and cytokine expression in broiler chickens. *Poultry Science*. 2017; 96: 966–975.

Kawanishi M., Yoshida T., Yagashiro S., Kijima M., Yagyū K., Nakai T., Murakami M., Morita H., Suzuki. S. Differences between *Lactococcus garvieae* isolated from the genus *Seriola* in Japan and those isolated from other animals (trout, terrestrial animals from Europe) with regard to pathogenicity, phage susceptibility and genetic characterization. *Journal of Applied Microbiology*. 2006; 101: 496–504.

Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal Food Microbiology*. 1998; 41: 103–125.

Klesius P.H., Evans J.J., Shoemaker C.A. Warmwater fish vaccinology in catfish production. *Animal Health Research Reviews* 2004; 5: 305.

Kusuda R., Kawa K., Salat F., Banner C.R., Fryer J.L. *Enterococcus seriolicida* sp. nov. a fish pathogen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1991; 41: 406–409.

Lee D.J., Drongowski R.A., Coran A.G., Harmon C.M. Evaluation of probiotic treatment in a neonatal animal model. *Pediatric Surgery International*. 2000; 16: 237–242.

Liu K., Chiu Ch., Shiu Y., Cheng W., Liu Ch. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish Shellfish Immunology*. 2010; 28: 837–844.

Loh T.C., Thanh N.T., Foo H.L., Hair-Bejo M., Azhar B.K. Feeding of different levels of metabolite combinations produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance, fecal microflora, volatile fatty acids and villi height in broilers. *Animal Science Journal*. 2010; 81: 205–214.

Loh T.C, Foo H.L, Sazili A.Q, Bejo M.H. Effects of feeding different postbiotic metabolite combinations produced by *Lactobacillus plantarum* strains on egg quality and production performance, faecal parameters and plasma cholesterol in laying hens. *BMC Veterinary Research*. 2014; 10: 149.

LVMP (Legislation on Veterinary Medicinal Products and Medicated Feed). EUBusiness.com, 2018. Available at: <https://www.eubusiness.com/topics/health/vmp> Accessed 23 Dec 2019.

Mabhiza D., Chitemerere T., Mukanganyama. S. Antibacterial properties of alkaloid extracts from *Callistemon citrinus* and *Vernonia adoensis* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medicinal Chemistry*. 2016; 2016: 304163.

Madsen K., Cornish A., Soper P., Mckaigney C., Jijon H., Yachimec C., Doyle J., Jewell L., De Simone C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology*. 2001; 121: 580–591.

Malek A., De la Hoz A., Gomez-Villegas S.I., Nowbakht C., Arias C.A. *Lactococcus garvieae*, an unusual pathogen in infective endocarditis: case report and review of the literature. *BMC Infectious diseases*. 2019; 19: 301.

Marteau P., Shanahan F. Basic aspects and pharmacology of probiotics: An overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. Best Practice and Research. Clinical. *Gastroenterology*. 2003; 17: 725–740.

Melgar-Valdes C.E., Barba Macías E., Álvarez-González C.A., Tovilla Hernández C., Sánchez A.J. Efecto de microorganismos con potencial probiótico en la calidad del agua y el crecimiento de camarón *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: *Penaeidae*) en cultivo intensivo. *Revista de Biología Tropical*. 2013; 61: 1215–1228.

Menanteau-Ledouble S., Krauss I., Santos G., Fibi S., Weber B., El-Matbouli. M. Effect of a phytogenic feed additive on the susceptibility of *Oncorhynchus mykiss* to *Aeromonas salmonicida*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2015; 115: 57–66.

Merrifield D.L., Dimitrioglou A., Foey A., Davies S.J., Baker R.T., Bogwald J, Castex M., Ringo E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*. 2010; 302: 1–18.

Meyburgh C.M., Bragg R.R., Boucher C.E. *Lactococcus garvieae*: an emerging bacterial pathogen of fish. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2017; 123: 67–79.

Mitsch P., Zitterl-Eglseer K., Kohler B., Gabler C., Los. R., Zimpf I. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poultry Science*. 2004; 83: 669–675.

Miyauchi E., Toh H., NaKano A., Tanabe S., Morita H. Comparative genomic analysis of *Lactococcus garvieae* strains isolated from different sources reveals candidate virulence genes. *International Journal of Microbiology*. 2012; 2012: 728276.

Mofredj A., Baraka D., Cadranel J., Lemaitre P., Kloeti G., Dumont J. *Lactococcus garvieae* septicemia with liver abscess in an immunosuppressed patient. *The American Journal of Medicine*. 2000; 109: 513–514.

Mora-Sánchez B., Balcázar J.L., Pérez-Sánchez T. Effect of a novel postbiotic containing lactic acid bacterium on the intestinal microbiota and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biotechnology Letters*. 2020; 42: 1957–1962.

Morales-Covarrubias M., Garcias-Aguilar N., del Carmen Bolan-Mejía M., Puello-Cruz A. Evaluation of medicinal plants and colloidal silver efficiency against *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei* cultured at low salinity. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2016; 122: 57–65.

Moriarty J.W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*. 1998; 164: 351–358.

Morita H., Tho H., Oshima K., Yoshisaki M., Kawanishi M., Nakaya K., Suzuki T., Miyauchi T., Ishii T., Tanabe S., Murakami M., Hattori M. Complete genome sequence and comparative analysis of the fish pathogen *Lactococcus garvieae*. *PLoS One*. 2011; 6: 23184.

Motiur M., Islam A., Islam A. Investigation of semi-intensive culture system of shrimp with special reference to soil-water characteristics of Bangladesh. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 2017; 5: 42-49.

Muthusamy N., Sankar V. Phytogetic compounds used as feed additives in poultry production. *International Journal of Science Environment and Technology*. 2015; 4: 167–171.

Muzquiz J.L, Royo F.M., Ortega C., de Blas I., Ruiz I., Alonso J.L. Pathogenicity of Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): dependence on age of diseased fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 1999; 19: 114–119.

Nayak S.K. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*. 2010; 29: 2–14.

Nikoskelainen S., Salminen S., Bylund G., Ouwehand A.C. Characterization of the properties of human and dairy derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001; 67: 2430–2435.

Norqvist A., Hagström Å., Wolf-Watz N.S. Protection of rainbow trout against vibriosis and furunculosis by the use of attenuated strains of *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989; 55: 1400–1405.

OIE (World Organisation for Animal Health). OIE Standards, Guidelines and Resolution on antimicrobial resistance and the use of antimicrobial agents. 2015. Paris, France. 127 pp.

Ortiz C., López J., Del Am. E., Sevilla T., García P., San Román J. *Lactococcus garvieae* infective endocarditis: report of 2 cases and review of the literature. *Spanish Journal of Cardiology*. 2014; 67: 776–778.

Ozturk R.C., Altinok I. Bacterial and viral fish diseases in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2014; 14: 275–297.

Palacios M., Zamora M., Velázquez J., Zamora E., Duran A. *Streptococcus* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Spain. *Bulletin Italian Society of Fish Pathology*. 1993; 5: 11–16.

Perera R.P., Johnson S.K., Collins.M.D., Lewis D.H. *Streptococcus iniae* associates with mortality of Tilapia nilotica T aurea hybrids. *Journal of Aquatic Animal Health*. 1994; 6: 335–340.

Pérez T., Balcázar J.L., Ruiz-Zarzuela I., Halaihel N., Vendrell D., De Blas I., Múzquiz J.L. Host–microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunology*. 2010; 3: 355–360.

Pérez T., Balcázar J.L., Merrifield D., Carnevali O., Gioacchini G., De Blas I., Ruiz-Zarzuela I. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish and Shellfish Immunology*. 2011; 31: 196–201.

Pérez-Sánchez T., Ruiz-Zarzuela I., De Blas I., Balcázar J.L. Probiotics in aquaculture a current assessment. *Reviews in Aquaculture*. 2014; 6: 133–146.

Pérez-Sánchez T., Mora-Sánchez B., Balcázar J.L. Biological approaches for disease control in aquaculture: Advantages, limitations and challenges. *Trends in Microbiology*. 2018; 26: 896–903.

Pérez-Sánchez T., Mora-Sánchez B., Vargas A., Balcázar J.L. Changes in intestinal microbiota and disease resistance following dietary postbiotic supplementation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Microbial Pathogenesis*. 2020; 142: 104060.

Peterson B.C., Peatman E., Ourth D.D., Waldbieser G.C. Phytogenic feed-additive effects on channel catfish rhamnose-binding lectin levels, and susceptibility to *Edwardsiella ictaluri*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2018; 129: 99–106.

Pirarat N., Kobayashi T., Katagiri T., Maita M., Endo, M. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2006; 113: 339-347.

Platel K., Srinivasa K. Digestive stimulant action of spices: a myth or reality?. *Indian Journal of Medical Research*. 2004; 119: 167.

Ramos M.A., Batista S., Pires M., Silva A., Pereira L., Saavedra M., Ozório R., Rema P. Dietary probiotic supplementation improves growth and the intestinal morphology of Nile tilapia. *Animal*. 2017; 11: 1259–1269.

Robertsen B. Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish and Shellfish Immunology*. 1999; 9: 269–290.

Rodgers C.J. Resistance of *Yersinia ruckeri* to antimicrobial agents in vitro. *Aquaculture*. 2001; 196: 325–45.

Romalde J.L., Magarinos B., Nunez S., Barja J.L., Toranzo A.E. Host range susceptibility of *Enterococcus* sp. strains isolated from diseased turbot: possible routes of infection. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996; 62: 607–611.

Romalde J.L., Luzardo-Alvarez A., Ravelo C., Toranzo A.E., Blanco-Mendez J. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture*. 2004; 236: 119–129.

Romero J., Feijoo C. G., Navarrete P. Antibiotics in aquaculture-use, abuse and alternatives. *Health and Environment in Aquaculture*. 2012; 159–198.

Roy N.K., Deka A., Bordoloi D., Mishra S., Kumar A. P., Sethi G., Kunnumakkara A. B. The potential role of boswellic acids in cancer prevention and treatment. *Cancer Letters*. 2016; 377: 74–86.

Runyoro D., Ngassapa O., Vagionas K., Aligiannis N., Graikou K., Chinou I. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. *Food Chemistry*. 2010; 119: 311–316.

Russo G., Lannetta M., D’Abramo A., Mascellino M.T., Pantosti A., Erario L., Tebano G., Oliva A., D’Agostino C., Trinchieri V., Vullo V. *Lactococcus garvieae* endocarditis in a patient with colonic diverticulosis: first case report in Italy and review of the literature. *New Microbiologica*. 2012; 35: 495–501.

Shao Z.J. Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001; 50: 229–243.

Schleifer K., Kraus J., Dvorak C., Kilpper-Balz K., Collins C., Fischer W. Transfer of *Streptococcus lactis* and related *streptococci* to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. 1985; 6: 183–195.

Schmidt A.S., Bruun M.S., Dalsgaard I., Pedersen K., Larsen J.L. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66: 4908–4915.

Shazali N., Foo H., Loh T.C., Choe D.W., Rahim R. A. Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from the faeces of broiler chicken in Malaysia. *Gut Pathogens*. 2014; 6: 1.

Sivaram V., Babu M., Immanuel G., Murugadass S., Citarasu T., Marian M. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquaculture*. 2004; 237: 9–20.

Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A., Kämpfer P., Maiden M.C., Nesme X., Rosselló-Mora R., Swings J., Trüper H.G., Vauterin L., Ward A.C., Whitman W.B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002; 52: 1043–1047.

Stiles M.E., Holzapfel W.H. Lactic acid bacterium of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 1997; 36: 1–29.

Stoni. A, Zitterl-Egelseer. K, Kroismayr. A, Wetscherek. W, Windisch. W. Tissue recovery of essential oils used as feed additive in piglet feeding and impact on nutrient digestibility. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*. 2006; 15: 60.

Taverniti V., Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes & Nutrition*. 2011; 6: 261–274.

Teixeira L.M., Merquior V.L., Vianni M.D., Carvalho M.D., Fracalanza S.E., Steigerwalt A.G., Brenner D., Facklam R.R. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1996; 46: 664–668.

Thanh N.T., Chwen L.T., Foo H.L., Hair-Bejo M., Kasim A.B. Inhibitory activity of metabolites produced by strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Malaysian fermented food. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. 2010; 5: 37.

Thanh N.T., Loh T.C., Foo H.L., Hair-Bejo M., Azhar B.K. Effects of feeding metabolite combinations produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance, faecal

microbial population, small intestine villus height and faecal volatile fatty acids in broilers. *British Poultry Science*. 2009; 50: 298–306.

Thomas D.W., Greer F.R. Probiotics and Prebiotics in Pediatrics. *Pediatrics*. 2010; 126: 1217–31.

Thu T.V., Loh T.C., Foo H.L., Yaakub H., Bejo M.H. Effects of liquid metabolites combinations produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance, faeces characteristics, intestinal morphology and diarrhea incidence in postweaning piglets. *Tropical Animal Health and Production*. 2011; 43: 69–75.

Torrecillas S., Terova G., Makol A., Serradell A., Valdenegro V., Gini E., Izquierdo M., Acosta F., Montero D. Dietary phytochemicals and galactomannan oligosaccharides in low fish meal and fish oil-based diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: Effects on gut health and implications on in vivo gut bacterial translocation. *PLoS One*. 2019; 14: e0222063.

Treves-Brown K.M. Tetracyclines. *Applied Fish Pharmacology*. 2000; 64–82.

Tsilingiri K., Barbosa T., Penna G., Caprioli F., Sonzogni A., Viale G., Rescigno M. Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised *in-vivo* organ culture model. *Gut*. 2012; 61: 1007–1015.

Vendrell D., Balcázar J.L., Ruiz I., De Blas I., Gironés O., Múzquiz J.L. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2006; 29: 177–198.

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

Vinh D.C., Nichol. K.A., Rand F., Embil. J.M. Native-valve bacterial endocarditis caused by *Lactococcus garvieae*. *Diagnostic. Microbiology and Infectious Disease*. 2006; 56: 91–94.

Wang Y.G., Lee K.L., Najiah M., Shariff M., Hassan M.D. A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. *Diseases of aquatic organisms*. 2000; 41: 9-18.

Wanka K.M., Damerou T., Costas B., Krueger A., Schulz C., Wuertz S. Isolation and characterization of native probiotics for fish farming. *BMC Microbiology*. 2018; 18: 119.

Watts J.E., Schreier H.J., Lanska L., Hale M.S. The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: sources, sinks and solutions. *Marine Drugs*. 2017; 15: 158.

WHO (World Health Organization). Global action Plan on antimicrobial resistance. 2015. 28 pp.

Wilfart A., Montagne L., Simmins P.H., Van Milgen J., Noblet J. Sites of nutrient digestion in growing pigs. Effect of dietary fiber. *Journal of Animal Science*. 2007; 85: 976–983.

Wu X., Teame T., Hao Q., Ding Q., Liu H., Ran C., Zhang Z. Use of a paraprobiotic and postbiotic feed supplement (HWF™) improves the growth performance, composition and function of gut microbiota in hybrid sturgeon (*Acipenser baerii* x *Acipenser schrenckii*). *Fish and Shellfish Immunology* 2020; 104: 36–45.

Yang H., Egan J.M., Wang Y., Moyes C.D., Roth J., Montrose M.H., Montrose-Rafizadeh C. GLP-1 action in L6 myotubes is via a receptor different from the pancreatic GLP-1 receptor. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1998; 275: 675-683.

Yamaguchi D.J., Yan F., Polk D.B. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG stimulates proliferation during intestinal epithelial cell wound repair. *Journal Pediatric Gastroenterology Nutrition*. 2003; 37: 395.

Yitbarek M. B. Phytogetic as feed additives in poultry production: a review. *International Journal of Extensive Research*. 2015; 3: 49–60.

Yiu K., Siu C., To K., Jim M., Lee K., Lau C., Tse H. A rare cause of infective endocarditis; *Lactococcus garvieae*. *International Journal Cardiology*. 2007; 114: 286–287.

Zheng X., Duan Y., Dong H., Zhang J. Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* in different treatments on growth performance and immune gene expression of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under normal condition and stress of acute low salinity. *Fish and Shellfish Immunology*. 2017; 62: 195–201.

10. Apéndices

10.1. Características de las revistas

En el presente apéndice se indican el factor de impacto (IF) y las áreas temáticas correspondientes a las revistas donde se han publicado los trabajos incluidos en la presente Tesis Doctoral.

Todos los valores se han obtenido del *Journal Citation Reports* (JCR) disponible en Clarivate Analytics. En cada una de las áreas temáticas señaladas se indica entre paréntesis la posición de la revista indicada sobre el total de revistas incluidas en el área de estudio.

Revista	Trends in Microbiology		
IF	13.546	Año	2019
Áreas temáticas	Microbiology (6/135)		

Revista	Acta Veterinaria Scandinavica		
IF	1.683	Año	2019
Áreas temáticas	Veterinary Sciences (39/142)		

Revista	Microbial Pathogenesis		
IF	2.914	Año	2019
Áreas temáticas	Microbiology (69/135)		

Revista	Biotechnology Letters		
IF	1.977	Año	2019
Áreas temáticas	Biotechnology & Applied Microbiology (107/156)		

10.2. Contribución de la doctoranda

La doctoranda es la primera o segunda autora de todos los trabajos presentados en esta Tesis Doctoral, lo que justifica plenamente su contribución.


Además, debemos indicar que todos los coautores son doctores, con la excepción de D. Augusto Vargas González, quien renuncia expresamente a presentar el trabajo del que es coautor como parte de otra Tesis Doctoral, tal y como consta en el documento que se incluye a continuación.

RENUNCIA DE LOS COAUTORES DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS COMO PARTE DE UNA TESIS DOCTORAL EN LA MODALIDAD DE COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Vargas González	Nombre: Augusto	
DNI/Pasaporte/NIE: F16402486	Teléfono +56 9 4231 2433	Correo electrónico augusto.vargas.ceo@gmail.com

2.- Tesis Doctoral
Título: Herramientas de control biológico para la prevención de la lactococosis en el cultivo de trucha arcoíris (Oncorhynchus mykiss)
Autor: Brenda del Socorro Mora Sánchez
Programa de doctorado: Medicina y Sanidad Animal

3.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que el firmante es coautor
Pérez-Sánchez T., Mora-Sánchez B., Vargas A., Balcázar J.L. 2020. Changes in intestinal microbiota and disease resistance following dietary postbiotic supplementation in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Microbial Pathogenesis 142, 104060. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104060

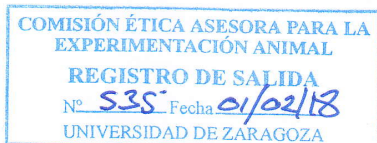
RENUNCIA:
Renuncio a que las publicaciones anteriores puedan ser presentadas como parte de otra tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.
<lugar>, <fecha> Puerto Montt 24 de julio de 2020

Firma: F 16302486

10.3. Procedimientos de experimentación

Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza y autorizados por el Gobierno de Aragón (no. de autorización: **PI57/17** y **PI35/20**). El cuidado y mantenimiento de los animales se realizó conforme a la normativa vigente RD 53/2013 para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos.



**Comisión ética
asesora para la
experimentación animal**
Universidad Zaragoza



Ref. PI57/17

CONTROL DE BUENA PRÁCTICA EN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Título del procedimiento de experimentación:

Evaluación del efecto protector *in vivo* de cepas probióticas y de un producto comercial elaborado a partir de cítricos frente a uno de los principales patógenos que afectan al cultivo de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*)

Título del proyecto en el que se incluye:

Evaluación del efecto protector *in vivo* de cepas probióticas y de un producto comercial elaborado a partir de cítricos frente a uno de los principales patógenos que afectan al cultivo de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*)

Tipo de proyecto: III **Centro de realización:** ES 50 297 0012 006 (SAEA)

Investigador responsable: José Luis Balcázar Rojas

Duración: 6 meses **Fecha estimada de inicio del procedimiento:** Noviembre, 2017

Animales que implica:

especie (s): Peces (*Pisces*)

peculiaridades: Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), 20-30g

número: 100

Severidad: Severo

Evaluación retrospectiva: SÍ

Fecha de presentación: 6 de noviembre de 2017

Reunida la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal* el día 11 de enero de 2018, y una vez revisada la documentación disponible en relación al procedimiento de experimentación descrito, considera:

QUE EL PROCEDIMIENTO CUMPLE LOS PRINCIPIOS ÉTICOS Y DE PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES UTILIZADOS PARA EXPERIMENTACIÓN QUE SE HA IMPUESTO LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, Y SE ADAPTA A LA NORMATIVA VIGENTE (R.D. 53/2013). Por todo ello, se emite **informe FAVORABLE****.

Esta evaluación será válida únicamente para ESTE PROCEDIMIENTO y durante un periodo de tiempo de cinco años, salvo modificación sustancial del procedimiento presentado. La realización del procedimiento queda supeditada igualmente a la disponibilidad de las instalaciones necesarias en el momento en que se plantee la realización del mismo.

*Órgano habilitado para realizar la evaluación y evaluación retrospectiva (Resolución de 6 de agosto de 2013 de la Dirección General de Alimentación y Fomento Agroalimentario del Gobierno de Aragón).

****Observaciones:** Precisa autorización del órgano competente para utilización de animales no criados para ser utilizados en procedimientos (Art. 19): Piscifactoría Viveros del Soto Oliván.

En Zaragoza, a 18 de enero de 2018

EL SECRETARIO DE LA COMISIÓN

Jorge Palacios Liesa

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN

Luis Miguel García Vinuesa

La Dirección General de Alimentación y Fomento Agroalimentario del Gobierno de Aragón, a la vista de la evaluación emitida por el órgano habilitado, autoriza la realización del proyecto en los términos descritos en la solicitud.

Fecha: 24/01/2018

Enrique Novales Allué

Director General de Alimentación y Fomento Agroalimentario



Comisión ética
asesora para la
experimentación animal
Universidad Zaragoza



Ref. PI35/20

CONTROL DE BUENA PRÁCTICA EN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Título del procedimiento de experimentación:

Evaluación del efecto protector *in vivo* de postbióticos y de un producto elaborado a partir de cítricos frente al agente patógeno *Lactococcus garvieae* que afecta al cultivo de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Título del proyecto en el que se incluye:

Evaluación del efecto protector *in vivo* de postbióticos y de un producto elaborado a partir de cítricos frente al agente patógeno *Lactococcus garvieae* que afecta al cultivo de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Tipo de proyecto: III Centro de realización: ES 50 297 0012 006 (SEA)

Investigador responsable: José Luis Balcázar Rojas

Duración: 6 meses Fecha estimada de inicio del procedimiento: Marzo, 2020

Animales que implica:

especie (s): Peces (*Pisces*)

peculiaridades: Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), 20-30g

número: 200

Severidad: Severo

Evaluación retrospectiva: SÍ

Fecha de presentación: 4 de marzo de 2020

Reunida la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal* el día 8 de mayo de 2020, y una vez revisada la documentación disponible en relación al procedimiento de experimentación descrito, considera:

QUE EL PROCEDIMIENTO CUMPLE LOS PRINCIPIOS ÉTICOS Y DE PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES UTILIZADOS PARA EXPERIMENTACIÓN QUE SE HA IMPUESTO LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, Y SE ADAPTA A LA NORMATIVA VIGENTE (R.D. 53/2013). Por todo ello, se emite **informe FAVORABLE****.

Esta evaluación será válida únicamente para ESTE PROCEDIMIENTO y durante un periodo de tiempo de cinco años, salvo modificación sustancial del procedimiento presentado. La realización del procedimiento queda supeditada igualmente a la disponibilidad de las instalaciones necesarias en el momento en que se plantee la realización del mismo.

*Órgano habilitado para realizar la evaluación y evaluación retrospectiva (Resolución de 6 de agosto de 2013 de la Dirección General de Alimentación y Fomento Agroalimentario del Gobierno de Aragón).

**Observaciones: (1) Debe presentarse evaluación retrospectiva a la finalización del proyecto y (2) Debe llevarse un registro de la severidad del procedimiento que permita trasladar la severidad real experimentada por los animales al centro.

En Zaragoza, a 15 de mayo de 2020

EL SECRETARIO DE LA COMISIÓN

Jorge Palacio Liesa

LA PRESIDENTA DE LA COMISIÓN

Blanca Ros Latienda

La Dirección General de Calidad y Seguridad Alimentaria del Gobierno de Aragón, a la vista de la evaluación emitida por el órgano habilitado, autoriza la realización del proyecto en los términos descritos en la solicitud.
Fecha: - y JUN, 2020



Enrique Novales Allue
Director General de Calidad y Seguridad Alimentaria