



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**Nuevos avances en el estudio *in vitro* de la cepa probiótica
Shewanella Pdp11. Evaluación de su potencial paraprobiótico y
postbiótico**

Memoria presentada por
Marta Domínguez Maqueda

PROGRAMA DE DOCTORADO
Biología Celular y Molecular

TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

Tutor: Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez

Directores: Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez y M^a Carmen Balebona
Accino



Málaga, Febrero 2025



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTORA: Marta Domínguez Maqueda

 <http://orcid.org/0000-0001-5605-7071>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



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

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

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

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

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



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TESIS DOCTORAL

**Nuevos avances en el estudio *in vitro* de la cepa probiótica
Shewanella Pdp11. Evaluación de su potencial paraprobiótico y
postbiótico**

Memoria presentada por
Marta Domínguez Maqueda

PROGRAMA DE DOCTORADO

Biología Celular y Molecular

TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

La Dra. Dña. María Dolores Castro López, Catedrática de Microbiología y Directora del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

INFORMA QUE:

Dña. Marta Domínguez Maqueda ha realizado en los laboratorios de este Departamento el trabajo experimental conducente a la elaboración de la presente memoria de Tesis Doctoral titulada “Nuevos avances en el estudio *in vitro* de la cepa probiótica *Shewanella* Pdp11. Evaluación de su potencial paraprobiótico y postbiótico”.

Y para que así conste firmo el presente informe,

Dra. Dña. María Dolores Castro López

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña MARTA DOMÍNGUEZ MAQUEDA

Estudiante del programa de doctorado BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: *NUEVOS AVANCES EN EL ESTUDIO IN VITRO DE LA CEPA PROBIÓTICA SHEWANELLA PDP11. EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL PARAPROBIÓTICO Y POSTBIÓTICO.*

Realizada bajo la tutorización de MIGUEL ÁNGEL MORIÑIGO GUTIÉRREZ y dirección de M^aCARMEN BALEBONA ACCINO

DECLARA QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asume, ante la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 22 de ABRIL de 2025

Fdo.: MARTA DOMÍNGUEZ MAQUEDA Doctorando/a	Fdo.: MIGUEL ÁNGEL MORIÑIGO GUTIÉRREZ Tutor/a
Fdo.: MIGUEL ÁNGEL MORIÑIGO GUTIÉRREZ Director/es de tesis	Fdo.: M^a CARMEN BALEBONA ACCINO Director/es de tesis



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

La Dra. M^a Carmen Balebona Accino y el Dr. Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez,
profesores de la Universidad de Málaga,

HACEN CONSTAR:

Que la presente memoria de Tesis Doctoral titulada “Nuevos avances en el estudio *in vitro* de la cepa probiótica *Shewanella* Pdp11. Evaluación de su potencial paraprobiótico y postbiótico” presentada por Dña. Marta Domínguez Maqueda para optar al grado de Doctora por la Universidad de Málaga, ha sido realizada en dicha universidad bajo su dirección.

Como directores de la tesis, hacen constar que las publicaciones que avalan la tesis mencionada no han sido utilizadas previamente en otras tesis doctorales. Asimismo, consideran que la presente memoria reúne todos los requisitos para ser presentada como tesis por compendio de publicaciones, por lo que autorizan su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman el presente documento,

Dr. D. Miguel Ángel Moriñigo
Gutiérrez

Dra. Dña. M^a Carmen
Balebona Accino

FINANCIACIÓN

Los ensayos realizados en el marco de esta Tesis Doctoral han sido financiados por los siguientes proyectos:

Proyectos de investigación AGL2014-51839-C5-2-R y AGL2017-83370-C3-3-R del Ministerio de Economía y Competitividad, cofinanciados por fondos FEDER.

Proyectos de investigación PID2020-113637RB-C21 y PID2020-113637RB-C22 del Ministerio de Ciencia e Innovación (MCIN/AEI/10.13039/ 501100011033), cofinanciado por el programa ThinkInAzul y la ayuda de la comisión de fondos de la Unión Europea Next Generation UE (PRTR C17.II) y la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia-Fundación Séneca.





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

COMUNICACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA TESIS

La presente Tesis Doctoral incluye cinco artículos científicos publicados en revistas de investigación internacionales indexadas en “Journal of Citation Report” (JCR). La metodología y los resultados recogidos en estos artículos forman parte de la Tesis Doctoral.

PUBLICACIÓN 1

- **Marta Domínguez Maqueda**, Olivia Pérez Gómez, Ana Grande-Pérez, Consuelo Esteve, Pedro Seoane, Silvana Teresa Tapia-Paniagua, María Carmen Balebona, Miguel Ángel Moriñigo (2022). Pathogenic strains of *Shewanella putrefaciens* contain plasmids that are absent in the probiotic strain Pdp11. PeerJ 10:e14248. <https://doi.org/10.7717/peerj.14248>

PUBLICACIÓN 2

- **Marta Domínguez Maqueda**; Isabel María Cerezo Ortega, Silvana Teresa Tapia Paniagua, Inés García De la Banda, Xabier Moreno Ventas; Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez, María Carmen Balebona Accino (2021). A Tentative Study of the Effects of Heat-Inactivation of the Probiotic Strain *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on Senegalese Sole (*Solea senegalensis*) Intestinal Microbiota and Immune Response. Microorganisms. 9 - 4, pp. 808 - 808. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040808>

PUBLICACIÓN 3

- **Marta Domínguez-Maqueda**, Jorge García-Márquez, Silvana T. Tapia-Paniagua, Carmen González-Fernández, Alberto Cuesta, Cristóbal Espinosa-Ruiz, María Ángeles Esteban, Francisco Javier Alarcón, María Carmen Balebona, Miguel Ángel Moriñigo (2023). Evaluation of the Differential Postbiotic Potential of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 Cultured in Several Growing Conditions. Marine Biotechnology, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s10126-023-10271-y>

PUBLICACIÓN 4

- **Marta Domínguez-Maqueda**, Olivia Pérez-Gómez, Jorge García-Márquez, Cristóbal Espinosa-Ruiz, Alberto Cuesta, María Ángeles Esteban, Francisco Javier Alarcón, Casimiro Cárdenas, Silvana T. Tapia-Paniagua, María Carmen Balebona, Miguel Ángel Moriñigo (2024). Microalgae and cyanobacteria as microbial substrate and their influence on the potential postbiotic capability of a bacterial probiotic. Microbial Biotechnology, 17(11), e70046. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.70046>

PUBLICACIÓN 5

- **Marta Domínguez-Maqueda**, Cristóbal Espinosa-Ruiz, María Ángeles Esteban, Francisco Javier Alarcón, Silvana T. Tapia-Paniagua, María Carmen Balebona, Miguel Ángel Moriñigo (2024). An *ex vivo* approach in European seabass leucocytes supports the *in vitro* regulation by postbiotics of *Aip56* gene expression of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10255-x>

Asimismo, el desarrollo profesional de la doctoranda incluye su contribución en la autoría de tres capítulos de libro y otros artículos científicos, numerados y referenciados a continuación:

1.- Laura Pardo, **Marta Domínguez Maqueda**, Juan Antonio Cecilia, Manuel Pozo Rodríguez, Josy Osajima, Miguel Ángel Moriño, Francisco Franco (2020). Adsorption of *Salmonella* in Clay Minerals and Clay-Based Materials. *Minerals* (2075-163X), 10-2, p. 130. <https://doi.org/10.3390/min10020130>.

2.- Laura Pardo Canales, Salima Essih, Juan Antonio Cecilia, **Marta Domínguez Maqueda**, María Isabel Olmo Sánchez, Manuel Pozo Rodríguez, Francisco Ignacio Franco Duro (2020). Modification of the textural properties of palygorskite through microwave assisted acid treatment. Influence of the octahedral sheet composition. *Applied Clay Science*. 196, 105745. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2020.105745>.

3.- Isabel María Cerezo, **Marta Domínguez-Maqueda**, María Carmen Balebona, Eduardo Martínez-Manzanares, Salvador Arijó (2022). Application methods of probiotics and options. Probiotics in Aquaculture (pp. 25-52). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-98621-6_3.

4.- Patricia Moreno, Daniel Álvarez-Torres, María Carmen Balebona, **Marta Domínguez-Maqueda**, Miguel Ángel Moriño, Julia Béjar, María Carmen Alonso, Esther García-Rosado (2023). Inhibition of nervous necrosis virus replication by *Shewanella putrefaciens* Pdp11 extract. *Aquaculture*, 739812. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739812>

5.- Jorge García-Márquez, **Marta Domínguez-Maqueda**, Miguel Torres, Isabel M. Cerezo, Eva Ramos, Francisco Javier Alarcón, Juan Miguel Mancera, Juan Antonio Martos-Sitcha, Miguel Ángel Moriño, María Carmen Balebona (2023). Potential effects of microalgae-supplemented diets on the growth, blood parameters, and the activity of the intestinal microbiota in *Sparus aurata* and *Mugil cephalus*. *Fishes* 8, no. 8: 409. <https://doi.org/10.3390/fishes8080409>

6.- Jorge García-Márquez, Daniel Álvarez-Torres, Isabel M. Cerezo, **Marta Domínguez-Maqueda**, Félix L. Figueroa, Francisco Javier Alarcón, Gabriel Acién, Eduardo Martínez-Manzanares, Roberto T. Abdala-Díaz, Julia Béjar, Salvador Arijó (2023). Combined dietary administration of *Chlorella fusca* and ethanol-inactivated *Vibrio proteolyticus* modulates intestinal microbiota and gene expression in *Chelon labrosus*. *Animals* 13, no. 21: 3325. <https://doi.org/10.3390/ani13213325>

7.- Jorge García-Márquez, Daniel Álvarez-Torres, Isabel M. Cerezo, **Marta Domínguez-Maqueda**, Gabriel Acién, Francisco Javier Alarcón-López, Félix L. Figueroa, Eduardo Martínez-Manzanares, Roberto T. Abdala-Díaz, Julia Béjar, Salvador Arijó (2024). Effects of *Chlorella fusca*-supplemented diet on intestinal microbiota and gene expression related to metabolism, stress, and immune response in *Chelon labrosus*. *Algal Research*, 77,103362. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103362>.

8.- Jorge García-Márquez, Alba Galafat Díaz, Luis Molina-Roque, **Marta Domínguez-Maqueda**, Verónica De las Heras, Paula Simó-Mirabet, Antonio Javier Vizcaíno, Juan Antonio Martos-Sitcha, Franciso Javier Alarcón-López, Miguel Ángel Moriñigo, María Carmen Balebona. (2024). Microalgal and cyanobacterial biomasses modified the activity of extracellular products from *Bacillus pumilus*: An *in vitro* and *in vivo* assessment. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10350-z>.

9.- **Marta Domínguez-Maqueda**, Isabel María Cerezo, Eduardo Martínez-Manzanares, Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez y María del Carmen Balebona Accino (2024). Empleo de algas en la alimentación de peces (pp. 13-21). Investiga Azul, Ediciones Pirámide, Grupo Aaya. ISBN: 978-84-368-4994-3.

10.- Sonia Rohra-Benítez, **Marta Domínguez-Maqueda** y Silvana Teresa Tapia-Paniagua (2024). Probióticos y otros «-bióticos». Descubriendo los beneficios de los probióticos y otros aliados en acuicultura. Investiga Azul, Ediciones Pirámide, Grupo Aaya. ISBN: 978-84-368-4994-3.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A mi abuelo.

*Te dedico este peldaño más
de la escalera de mi vida.*



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

Han sido varios años los que me ha costado llegar hasta aquí. El camino ha sido largo, y en él me he tropezado con muchas personas que me han ayudado a caminar, a levantarme, a reír y a disfrutar del paisaje de la Ciencia.

Cada mención en este texto tiene un pequeño lugar en mi corazón de una u otra forma. Así que allá voy...

En primer lugar, quienes me brindaron la oportunidad, mis Directores de Tesis, Miguel Ángel Moriñigo y M^a Carmen Balebona. Para mí sois inspiración a parte de por vuestra trayectoria profesional, por ese don de gente y empatía que habéis mostrado en todo momento. Siempre con la puerta abierta, para hablar de Ciencia, o no. Soy afortunada de haberos tenido conmigo en este camino y haber aprendido de vosotros y con vosotros. Gracias también a Alejandro, hijo de M^a Carmen, por realizar esta portada tan bonita de Tesis.

Por supuesto agradecer a mi loca y segunda familia, mi súper jefe Francisco Franco y mi compañera Laura Pardo. Cualquiera no sabe lo que es una “nata” en este grupo. Paco me esperó y siempre confió en mí, y eso es algo que nunca voy a olvidar. Gracias por tu bondad, tu confianza y hacerme ver que puedo con todo. Por otra parte, Laura, mi versión 2.0, siamesas o clones nos llaman en la Facultad, pues siempre vamos juntas. Después de tantas horas de coche y muestreos hemos aprobado con creces la asignatura de la amistad.

Mi tiempo en el laboratorio 3 me ha hecho vivir lo que considero dos épocas diferentes, ambas con personas importantes para mí. La primera época, con una Marta recién llegada, con el apoyo y la enseñanza de Silvana, Milena, Alberto y Albertito. Gracias también por haber estado acompañándome en este camino, y seguir en él a pesar de las vueltas que da la vida. La segunda época la protagonizan los que se han convertido en un grupo de amigos. Isa, Dani, mis dos Jorges y Olivia. Gracias por haber hecho que el trabajo fuera divertido y formar tan buen equipo dentro y fuera del laboratorio. Gracias por entender mis caras, sobre todo las malas, aunque se que os hacen gracia y a nadie le infunden respeto. Me alegro que así sea porque significa que me conocéis.

Mención especial para Isa y Jorge García. Ellos tienen frío cuando yo tengo calor, y están cansados cuando yo quiero fiesta. Supongo que nos equilibramos, porque me dan luz, calma y ayuda siempre pero SIEMPRE que lo necesito. Os quiero mucho amigos.

Tengo que mencionar a nuestro laboratorio vecino. Gracias en primer lugar a mi gran descubrimiento científico y personal, Rocío Leiva. Es de esas personas vitamina que te aporta lo necesario cuando hace falta. Te quiero amiga. Gracias también a mis compañeros Ale y Juan. Juntos todos hemos pasado muy buenos momentos de cervecitas, de esas que dan la vida. Definitivamente ya somos dos grupos en uno.

Lejos de la Ciencia tengo a mis amigas y amigos (Milla tú te salvas). Ninguno tiene que ver con este mundo, lo cual me ha permitido quejarme o explicar en algún momento algo del trabajo y que asientan sin rebatirme nada. Porque para ellos el nombre de las bacterias parecen hechizos de Harry Potter, y porque se creen que sé todo sobre los seres vivos del planeta. Gracias por estar ahí y alegraros de esto tanto como yo.

Por último y con un papel fundamental, mi familia. Papá, mamá, hermana, tito Isi y tito Manolín, gracias por apoyarme y escucharme siempre, aunque a veces os resulte raro este mundillo en el que me muevo. Mis padres siempre me han animado a estudiar y a cumplir mis sueños. Aquí estoy por fin, agradeciendo cada aliento que me habéis brindado, que no ha sido poco...pero como siempre decimos “Familia unida, jamás será vencida”. A mi hermana podrían convalidarle alguna que otra asignatura de Biología simplemente por escucharme tanto. Ya se sabe el nombre de Pdp11 completo y sin trabarse, que es mucho. Es mi hermana y mi mejor amiga y sabe perfectamente acompañarme en silencio y animarme a carcajadas. Os quiero mucho.

Gracias a todos de corazón.

PREFACIO

La presente Tesis Doctoral tiene formato de tesis por compendio de publicaciones que cumple con las instrucciones estipuladas por el Artículo 55 del Reglamento 4/2022, de 24 de octubre, de la Universidad de Málaga, sobre los estudios de doctorado.

El formato empleado para su presentación consta de una introducción general y estado del arte que presenta los trabajos que avalan la Tesis Doctoral y justifica la unidad temática de los mismos. Posteriormente se plantean las hipótesis y objetivos iniciales que han llevado a la estructuración de la presente Tesis Doctoral, seguida de un resumen global de los resultados y una discusión general actualizada de los mismos. Además, se presentan las conclusiones más relevantes del conjunto del trabajo.

Finalmente se anexan los trabajos que avalan esta Tesis Doctoral. Son cinco trabajos que se componen de una introducción específica para cada uno de los temas, así como una metodología desarrollada en cada trabajo, descripción de resultados y discusión.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL Y ESTADO DEL ARTE	3
1. Probióticos	3
1.1. Definición de probiótico	3
1.2. Criterios para considerar a un microorganismo como probiótico	4
1.3. Mecanismos de acción de los probióticos	5
1.4. Probióticos en acuicultura	7
1.5. Limitaciones en el uso de probióticos	11
1.5.1. Legislación en la Unión Europea (UE)	12
1.6. <i>Shewanella</i> Pdp11 (SpPdp11) como probiótico	13
2. Derivados bióticos: paraprobióticos y postbióticos	16
2.1. Paraprobióticos	17
2.2. Postbióticos	21
2.3. Legislación en la Unión Europea (UE) sobre derivados bióticos	25
2.4. Mecanismos de acción de paraprobióticos y postbióticos	25
2.5. Aplicaciones de paraprobióticos y postbióticos en acuicultura	27
2.6. Ventajas adicionales de paraprobióticos y postbióticos	27
3. Modulación del potencial paraprobióticos y postbióticos	28
3.1. Modificación de parámetros físico-químicos para la obtención de postbióticos	30
3.2. Modificación de la composición del medio de cultivo para la obtención de postbióticos	30
3.2.1. Sustratos sostenibles. Microalgas	31
Referencias	33
 2. HIPÓTEIS Y OBJETIVOS	 53
 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL	 57
1. ¿Es relevante la presencia de plásmidos en las bacterias probióticas?	57
2. SpPdp11 como paraprobiótico inactivado por calor, ¿modula la microbiota y la inmunidad intestinal en <i>Solea senegalensis</i> ?	60
3. Potencial postbiótico del probiótico SpPdp11. Influencia de las condiciones de cultivo	66



3.1. La inclusión de pienso y el suplemento de sal como sustrato para el crecimiento de SpPdp11 y su efecto en la secreción de ECP	68
3.1.1. El sustrato y las condiciones de cultivo influyen en las actividades hidrolíticas de los ECP de SpPdp11	68
3.1.2. Las condiciones de cultivo de SpPdp11 influyen en sus ECP, que exhiben distintas capacidades antagonistas	70
3.1.3. Las condiciones de cultivo de SpPdp11 modula la capacidad antivírica de sus ECP.....	72
3.1.4. Las condiciones de cultivo de SpPdp11 para la obtención de los ECP influyen en la viabilidad de líneas celulares de peces.....	73
3.2. La inclusión de microalgas y cianobacterias como sustrato para el crecimiento de SpPdp11 y su efecto en la secreción de ECP	74
4. Los ECP de SpPdp11 afectan a la transcripción del gen codificante de la toxina Aip56 presente en <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> Lg 41/01	78
Referencias	82
4. CONCLUSIONES.....	103
5. PUBLICACIONES	105
PUBLICACIÓN 1. Pathogenic strains of <i>Shewanella putrefaciens</i> contain plasmids that are absent in the probiotic strain Pdp11	107
PUBLICACIÓN 2. A tentative study of the effects of heat-inactivation of the probiotic strain <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 on Senegalese sole (<i>Solea senegalensis</i>) intestinal microbiota and immune response	109
PUBLICACIÓN 3. Evaluation of the differential postbiotic potential of <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 cultured in several growing conditions.....	111
PUBLICACIÓN 4. Microalgae and cyanobacteria as microbial substrate and their influence on the potential postbiotic capability of a bacterial probiotic	113
PUBLICACIÓN 5. An <i>ex vivo</i> approach in European seabass leucocytes supports the <i>in vitro</i> regulation by postbiotics of <i>aip56</i> gene expression of <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	115

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN GENERAL 3

Figura 1. Modos de acción de los probióticos (Swain et al., 2023).....6

Figura 2. Tipos de componentes celulares considerados postbióticos según las recomendaciones de la ISAPP, 2021 22

Figura 3. Principales tipos de inactivación de microorganismos. Fuente: de Almada et al. (2016), modificado 29

PUBLICACIONES 105

PUBLICACIÓN 1. Pathogenic strains of *Shewanella putrefaciens* contain plasmids that are absent in the probiotic strain Pdp11 107

Figura 1. Flowchart depicting the workflow used to obtain fully assembled plasmid DNA sequences from *S. putrefaciens* strains SH4 and SH12.....5

Figura 2. Plasmid DNA isolated from different *S. putrefaciens* strains (SH4, SH12, SH6, SH16, SH9, Pdp11, SdM1 and SdM2) separated by agarose gel electrophoresis .7

Figura 3. Complete consensus sequences of pSH4 (A) and pSH12 (B) showing the unvalidated regions (blue line) resolved by mapping with Illumina and Sanger sequences.....8

Figura 4. Circular map of pSH4 (A) and pSH12 (B)..... 10

Figura 5. Phylogenetic tree using repB protein sequences of pSH12 and pSH4 12

Figura suplementaria 1. Validation representation by mapping of critic regions in plasmids pSH4 (A) and pSH12 (B) by Sanger and Illumina sequences and PCR amplicons (C) 8

Figura suplementaria 2. Genomic and plasmid synteny shared between pathogenic strains *S. putrefaciens* SH12 and *S. putrefaciens* SH4..... 10

PUBLICACIÓN 2. A tentative study of the effects of heat-inactivation of the probiotic strain *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) intestinal microbiota and immune response 109

Figura 1. Relative transcription (normalized with <i>actb2</i> and <i>rps4</i>) of genes involved in cellular stress in anterior (A) and posterior (B) intestinal sections of <i>S. senegalensis</i> fed with live (diet P) and inactivated (diet I) Pdp11 cells. Four genes including <i>hsp90aa</i> , <i>gp96</i> , <i>hsp70</i> and <i>hsp90ab</i> were analyzed by RT-qPCR	7
Figura 2. Relative transcription (normalized with <i>actb2</i> and <i>rps4</i>) of genes involved in cellular stress in anterior (A) and posterior (B) intestinal sections of <i>S. senegalensis</i> fed with live (diet P) and inactivated (diet I) Pdp11 cells. Four genes including <i>hsp90aa</i> , <i>gp96</i> , <i>hsp70</i> and <i>hsp90ab</i> were analyzed by RT-qPCR	8
Figura 3. Relative transcription (normalized with <i>actb2</i> and <i>rps4</i>) of genes involved in cellular stress in anterior (A) and posterior (B) intestinal sections of <i>S. senegalensis</i> fed with live (diet P) and inactivated (diet I) Pdp11 cells. Four genes including <i>c7</i> , <i>c3</i> and <i>lysc1</i> were analyzed by RT-qPCR.....	8
Figura 4. Microbiota composition (relative operational taxonomic units (OTUs) composition) at phylum level of pooled intestinal contents from anterior (A) and posterior (B) intestinal sections of <i>S. senegalensis</i> specimens fed with control diet (diet C) and diet supplemented with live (diet P) or inactivated (diet I) Pdp11 cells.....	9
Figura 5. Microbiota composition (relative operational taxonomic units (OTUs) composition) at family level of pooled intestinal contents from anterior (A) and posterior (B) intestinal sections of <i>S. senegalensis</i> specimens fed with control diet (diet C) and diet supplemented with live (diet P) or inactivated (diet I) Pdp11 cells	10
Figura 6. Microbiota composition (relative operational taxonomic units (OTUs) composition) at genus level of pooled intestinal contents from anterior (A) and posterior (B) intestinal sections of <i>S. senegalensis</i> specimens fed with control diet (diet C) and diet supplemented with live (diet P) or inactivated (diet I) Pdp11 cells	11
Figura suplementaria 1. Graphical representations of the sections 2.2 (Probiotic microorganism) and 2.3 (Experimental diets)	19
Figura suplementaria 2. Venn diagrams demonstrating the distribution of genera shared in the anterior (A) and posterior (B) intestinal sections of <i>S. senegalensis</i> specimens fed control diet (diet C) and the same supplemented with alive (diet P) or inactivated (diet I) cells of the probiotic	20

PUBLICACIÓN 3. Evaluation of the differential postbiotic potential of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 cultured in several growing conditions..... 111

Figura 1. Different conditions for ECP extraction and nomenclature used in this experiment 3

Figura 2. Biofilm formation inhibition of *Vibrio anguillarum* (a), *Aeromonas hydrophila* (b), *Tenacibaculum maritimum* (c), *Tenacibaculum soleae* (d), and *Tenacibaculum gallaicum* (e) after 24 h (a, b) and 48 h (c–e) of incubation of the different bacteria with ECP samples (µg protein/µL), extracted from different growing conditions of the *S. putrefaciens* Pdp11 strain.....8

Figura 3. Antiviral activity of the ECPs..... 10

Figura 4. Cytotoxic effect produced by ECPs of *S. putrefaciens* Pdp11 on various cell lines. a Brain cell line (FuB-1) from mummichog (*Fundulus heteroclitus*), b fish hepatoma cell line (PLHC-1) (*Poeciliopsis lucida*), c brain cell line (DLB-1) from European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), and d fibroblast cell line (SAF-1) (*Sparus aurata*)..... 11

PUBLICACIÓN 4. Microalgae and cyanobacteria as microbial substrate and their influence on the potential postbiotic capability of a bacterial probiotic 113

Figura 1. Culture conditions for SpPdp11 for ECPs extraction and nomenclature assigned 3

Figura 2. Cytotoxic effect produced by extracellular products (ECPs) from SpPdp11 and its internal controls on brain cell line of European sea bass (DLB-1) 6

Figura 3. Cytotoxic effect produced by extracellular products (ECPs) from SpPdp11 and its internal controls on brain cell line of mummichogs (FuB-1).....7

Figura 4. Cytotoxic effect produced by extracellular products (ECPs from SpPdp11 and its internal controls on clearfin livebearer hepatoma cell line (PLHC-1) 8

Figura 5. Cytotoxic effect produced by extracellular products (ECPs) from SpPdp11 and its internal controls on fibroblast cell line of gilthead seabream (SAF-1).....9

Figura 6. Volcano plots showing the distribution of identified proteins for SpPdp11 ECP conditions: (A) FM1548, (B) FM2324 and (C) M2324.....10

Figura 7. Venn diagram illustrating the distribution (unique or common) of all identified DEPs across different ECP conditions (FM2324 in blue, FM1548 in green and M2324 in yellow) compared to the control..... 11

PUBLICACIÓN 5. An *ex vivo* approach in European seabass leucocytes supports the *in vitro* regulation by postbiotics of *aip56* gene expression of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 115

Figura 1. Different conditions for ECP extraction and nomenclature used in this experiment.....3

Figura 2. Protocol of extraction of Phdp supernatant alone (Phdp-ECPs) and after adding SpPdp11-ECPs (T2348-ECP and FM1548-ECP) and ICs (T2348-IC and FM1548-IC).....5

Figura 3. Growth of Phdp (absorbance values, OD 595 nm) after 48 h incubation with ECP serial dilutions ($\mu\text{g protein } \mu\text{L}^{-1}$) extracted from *S. putrefaciens* Pdp11 probiotic strain cultured under different conditions 7

Figura 4. Cell death of European sea bass head kidney leucocytes (HKLs) after 24 h incubation with SpPdp11-ECPs and its respective ICs.....8

Figura 5. Cell viability parameters of European sea bass head kidney leucocytes (HKLs) after 24 h incubation with SpPdp11-ECPs and its respective ICs 9

Figura 6. Cellular innate immunity parameters of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head kidney leucocytes (HKLs) incubated for 24 h with different ECPs and ICs 10

Figura 7. Cellular innate immunity parameters of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head kidney leucocytes (HKLs) incubated for 24 h with different ECPs and ICs 11

Figura 8. Relative expression of *Phdp aip56* gene after adding SpPdp11-ECPs or their ICs ($\mu\text{g protein } \mu\text{L}^{-1}$) extracted from *S. putrefaciens* Pdp11 probiotic strain cultured under different conditions. “Phdp Control +” indicates expression value without ICs or ECPs added (control). 12

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN GENERAL 3

Tabla 1. Ejemplos de probióticos empleados en acuicultura.....9

Tabla 2. Ejemplos de paraprobióticos empleados en acuicultura 19

Tabla 3. Ejemplos de postbióticos empleados en acuicultura..... 23

RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL 57

Tabla 4. Nomenclatura utilizada para designar las condiciones de obtención de los ECP de las Publicaciones 3 y 4 68

PUBLICACIONES 105

PUBLICACIÓN 1. Pathogenic strains of *Shewanella putrefaciens* contain plasmids that are absent in the probiotic strain Pdp11 107

Tabla 1. Common ORFs found in pSH4 and pSH12 in all predictions tools tested. 9

Tabla 2. Functional annotation of the main ORFs of pSH4 and pSH12 by blastp and Phyre2 11

Tabla suplementaria 1. Limiting conditions for plasmid DNA isolation from different strains of *Shewanellas* sp.....7

Tabla suplementaria 2. Total ORFs found in pSH4 and pSH12 plasmids by ORF finder 9

PUBLICACIÓN 2. A tentative study of the effects of heat-inactivation of the probiotic strain *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) intestinal microbiota and immune response 109

Tabla 1. List of *S. senegalensis* genes analyzed in this study.....5

Tabla 2. Growth performance of *S. senegalensis* fed three different diets over 45 days 6

Tabla suplementaria 1. Relative microbial abundances at family level of the anterior and posterior intestinal sections of *S. senegalensis* specimens fed control diet (diet C)

and the same supplemented with alive (diet P) or inactivated (diet I) cells of the probiotics Pdp11 21

PUBLICACIÓN 3. Evaluation of the differential postbiotic potential of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 cultured in several growing conditions..... 111

Tabla 1. Hydrolytic activities produced by ECP samples (µg protein), extracted from different cultivation conditions, of the *S. putrefaciens* Pdp11 strain 6

Tabla 2. Hydrolytic activities produced by ECP samples (µg protein), extracted from different cultivation conditions, of the *S. putrefaciens* Pdp11 strain 7

Tabla suplementaria 1. Ingredient composition of the experimental diet used for the aquafeed culture media of ECP samples extraction..... 19

PUBLICACIÓN 4. Microalgae and cyanobacteria as microbial substrate and their influence on the potential postbiotic capability of a bacterial probiotic 113

Tabla 1. Hydrolytic activities of SpPdp11 ECPs extracted under different culture conditions 9

Tabla suplementaria 1. Ingredient composition of the experimental feeds used for the preparation of the experimental aquafeed and microalgae/cyanobacteria supplemented media for the extraction of ECP samples 19

Tabla suplementaria 2. COG analysis of the DEPs detected in each SpPdp11 ECP condition analysed 20

PUBLICACIÓN 5. An *ex vivo* approach in European seabass leucocytes supports the *in vitro* regulation by postbiotics of *aip56* gene expression of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 115

Tabla suplementaria 1. Ingredient composition of the experimental diet used for the aquafeed culture media of ECP samples extraction..... 16

LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

aa	Aminoácidos
ACs	Compuestos Aromáticos
<i>actb2</i>	Gen que codifica Beta actina 2
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
AGCC	Ácidos Grasos de Cadena Corta
AGCL	Ácidos Grasos de Cadena Larga
AHL	Acil-Homoserina Lactonas
AI	Autoinductor
AIP56	Toxina Inductora de Apoptosis de 56 kilodalton
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
bp	Pares de bases
<i>c3</i>	Gen que codifica el Componente 3 del sistema del Complemento
<i>c7</i>	Gen que codifica el Componente 7 del sistema del Complemento
CaCl ₂	Cloruro Cálcico
CD	Células Dendríticas
<i>cd4</i>	Gen que codifica el marcador linfocitario CD4
<i>cd8α</i>	Gen que codifica el marcador linfocitario CD8α
CDI	Inhibición del Crecimiento Dependiente de Contacto
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CFS	Sobrenadantes Libres de Células
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
CI	Control Interno
CMC	Carboximetilcelulosa
COG	Clústeres de Genes Ortólogos
CPE	Efecto Citopático
CV	Cristal Violeta
DEPC	Dietilpirocarbonato
DEPs	Proteínas Expresadas Diferencialmente
DLB-1	Línea celular de Cerebro de Lubina
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECM	Matriz Extracelular
ECP	Producto Extracelular
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EMEM	Medio Mínimo Esencial Eagle

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FBS	Suero Fetal Bovino
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FDA	Diacetato de Fluoresceína
FDR	Tasa de Falsos Descubrimientos
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FMM	Medio para <i>Flexibacter maritimus</i>
FuB-1	Línea celular de Cerebro de pez Fúndulo
GO	Ontología de Genes
<i>gp96</i>	Gen que codifica la Proteína de choque térmico 96
GRAS	Generalmente Reconocidos como Seguros
HEPES	Ácido n-2-hidroxietilpiperazina-n'-2-etanosulfónico
HKL	Leucocitos de Riñón Cefálico
HLC	Ácido hidroclorehídrico
<i>hsp70</i>	Gen que codifica la Proteína de choque térmico 70
<i>hsp90aa</i>	Gen que codifica la Proteína de choque térmico 90aa
<i>hsp90ab</i>	Gen que codifica la Proteína de choque térmico 90ab
IA	Intestino Anterior
IBDV	Virus de la Enfermedad de Bursitis Infecciosa
IDF	Federación Internacional de Lácteos
IFN-I	Interferón tipo I
Ig	Inmunoglobulina
<i>il-1β</i>	Gen que codifica la Interleucina 1 β
<i>il-6</i>	Gen que codifica la Interleucina 6
IP	Intestino Posterior
IPA	Asociación Internacional de Probióticos
ISAPP	Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos
kb	Kilobases
LB	Agar Luria-Bertani
LD50	Dosis Letal 50
<i>lys-c1</i>	Gen que codifica la Lisozima c1
MAMP	Patrón Molecular Asociado a Microorganismos
MGE	Elemento Genético Móvil
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
MRS	Man, Rogosa y Sharpe
NaCl	Cloruro Sódico
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica

NDI	Nuevos Alimentos Dietéticos
NDV	Virus de la Enfermedad de Newcastle
NGP	Probióticos de Nueva Generación
NGS	Secuenciación de Próxima Generación
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NNV	Virus de la Necrosis Nerviosa
NPS	Cepas No Probióticas
nt	Nucleótido
OMG	Organismo Modificado Genéticamente
OMV	Vesículas de Membrana Externa
ORF	Marco Abierto de Lectura
OTU	Unidad Taxonómica Operativa
PAHs	Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos
PAMP	Patrón Molecular Asociado a Patógeno
pb	Pares de Bases
PBS	Tampón Fosfato Salino
PCF	Fragmentos de Células Probióticas
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Phdp	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
PI	Yoduro Propidio
PLHC-1	Línea celular de hepatocarcinoma de pez ciproíno
PMG	Probióticos Modificados Genéticamente
PPAR	Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas
PRR	Receptores de Reconocimiento de Patrones
PSM	Coincidencia de Espectro de Péptidos
PUFA	Ácidos Grasos Poliinsaturados
QPS	Presunción Cualificada de Seguridad
QQ	<i>Quorum Quenching</i>
QS	<i>Quorum Sensing</i>
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SpPdp11	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11
TGI	Tracto Gastrointestinal
UT	Unidad Taxonómica
UV	Ultravioleta
WGS	Secuenciación del Genoma Completo



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

RESUMEN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

RESUMEN

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador. Actúan mediante diversos mecanismos como la exclusión competitiva de patógenos, la producción de sustancias antimicrobianas, la mejora de la barrera intestinal y la optimización de la biodisponibilidad de nutrientes. Favorecen la colonización y el desarrollo de una microbiota intestinal equilibrada, así como la secreción de diferentes compuestos bioactivos, dando lugar a una interacción positiva con la microbiota intestinal. A nivel inmunológico, los probióticos estimulan la inmunidad innata y adaptativa y la producción de diferentes células inmunes, contribuyendo a la función barrera de la mucosa intestinal.

En el sector de la acuicultura, que crece exponencialmente ante la gran demanda de proteína animal por parte de la población, los probióticos han demostrado ejercer multitud de estos beneficios como reforzar la barrera intestinal, mejorar la digestibilidad y la asimilación de nutrientes presentes en los piensos, y aumentar la resistencia a enfermedades en organismos cultivados. Así, ofrecen una alternativa a los antibióticos, supliendo problemas asociados a los mismos como el desarrollo de resistencias bacterianas, los efectos sobre el medio ambiente o la presencia de contaminantes en el producto final. No obstante, los probióticos como células viables también presentan una serie de limitaciones y riesgos, como por ejemplo, la transferencia a otros microorganismos de genes de resistencia a antibióticos o genes de virulencia, o en los peores casos, infecciones especialmente en hospedadores inmunodeprimidos.

La regulación existente sobre la seguridad de los probióticos presenta diferencias globales en las normativas, lo que a su vez genera ambigüedad legal. En la Unión Europea, existen probióticos aceptados y actualmente comercializados, y que previamente han sido evaluados minuciosamente para garantizar su seguridad. Según recomendaciones establecidas por la Asociación Internacional de Probióticos y Prebióticos en 2019, una cepa probiótica precisaría una caracterización fenotípica y genotípica, incluyendo la secuenciación del genoma y determinando la presencia de elementos susceptibles de transferencia horizontal entre microorganismos, como pueden ser la presencia de genes de virulencia o resistencia a antibióticos, plásmidos o profagos.

Un probiótico también debe demostrar su viabilidad durante toda su vida útil, tener la capacidad de modular el sistema inmune, adherirse al tracto gastrointestinal e interactuar positivamente con la microbiota del hospedador.

El estudio durante más de 20 años llevado a cabo por nuestro grupo de investigación sobre la cepa probiótica *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11), ha demostrado cómo este microorganismo cumple muchos de los requisitos asociados a los probióticos. SpPdp11 fue aislada de la piel de dorada (*Sparus aurata*) sana y ha sido caracterizado fenotípicamente de manera exhaustiva. Además, ha demostrado ejercer multitud de efectos beneficiosos en peces cultivados como la dorada y el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). La administración en la dieta de SpPdp11 como probiótico vivo promueve el crecimiento de los peces, mejora la eficiencia alimentaria y modula favorablemente la microbiota intestinal, estimulando positivamente el sistema inmunitario y la salud intestinal. A nivel genotípico, el genoma completo de SpPdp11 ha sido secuenciado y se ha determinado la presencia de genes que respaldan su capacidad probiótica en el mismo. Sin embargo, esta caracterización genotípica no incluía hasta el momento la determinación de la presencia de elementos móviles como son los plásmidos, uno de los requisitos necesarios para considerar a un microorganismo como buen candidato probiótico.

En esta tesis doctoral, la **Publicación 1** plantea la búsqueda de plásmidos en diferentes cepas de *Shewanella putrefaciens*. Estas cepas incluían la probiótica SpPdp11, cinco cepas patógenas (SH4, SH6, SH9, SH12 y SH16), y dos cepas saprofíticas (SdM1 y SdM2). Únicamente se encontraron plásmidos en dos de las cinco cepas patógenas (*pSH4* y *pSH12*) y no en la cepa probiótica ni en las dos saprofíticas analizadas. La caracterización de los plásmidos detectados se llevó a cabo, previa elaboración de un flujo de trabajo que integra secuencias de Sanger, obtenidas mediante extracción plasmídica experimental, e Illumina, obtenidas de la secuenciación del genoma completo de las cepas portadoras de plásmidos. El flujo permitió obtener secuencias consenso completas para ambos plásmidos. El análisis de secuencias mostró que dichos plásmidos codificaban una posible proteína iniciadora de replicación de la familia RepB, así como proteínas relacionadas con la estabilidad del plásmido y un sistema toxina-antitoxina. De esta forma se destacó la implicación de la presencia de plásmidos en la naturaleza probiótica o patogénica de *S. putrefaciens*, reforzando la seguridad y el

carácter probiótico de SpPdp11 ya que la ausencia de plásmidos se suma a los requisitos ya presentes sobre la consideración de buenos candidatos probióticos.

Sin embargo, las preocupaciones sobre la seguridad, aplicabilidad y funcionalidad asociadas a la viabilidad de los probióticos han dado lugar en los últimos años a estudios que plantean una búsqueda de alternativas más seguras y efectivas, como el uso de derivados bióticos, tales como paraprobióticos y postbióticos. Por este motivo, se planteó la evaluación de SpPdp11 como paraprobiótico. Se consideran paraprobióticos a “células microbianas no viables intactas o bien extractos crudos de células (con una composición química compleja), que cuando se administran (por vía oral o tópica) en cantidades adecuadas, confieren un beneficio al hospedador humano o animal”. Esta pérdida de viabilidad se produce utilizando diversos métodos de inactivación. En esta tesis se empleó la inactivación por calor, para a obtener SpPdp11 como paraprobiótico, considerándose una alternativa más segura que podría mantener los beneficios asociados al probiótico vivo.

Así, la **Publicación 2** evalúa la administración durante 45 días de SpPdp11 como paraprobiótico en la dieta de especímenes de *S. senegalensis* y su efecto sobre la microbiota y la inmunidad intestinal, en comparación con el probiótico vivo. Los peces que recibieron el probiótico vivo vieron mejorado su crecimiento significativamente con respecto al control. Sin embargo, esto no ocurrió tras la administración de SpPdp11 como paraprobiótico. Por el contrario, no hubo diferencias en la transcripción de genes asociados al sistema inmune intestinal entre los ejemplares alimentados con SpPdp11 vivo o inactivado por calor. En ambos casos se vio modulada la transcripción de ciertos genes, disminuyendo la transcripción en aquellos asociados al estrés celular (*hsp90ab* y *gp96*), y aumentando en los relacionados con alguna infección o daño (*cd4*, *cd8* e *il-1b*) y la actividad del complemento (*c3*). Sin embargo, sí se observaron diferencias en la modulación de la microbiota intestinal en función de la forma de administración del probiótico, vivo o inactivado por calor. Así, las células viables dieron lugar a una mayor diversidad microbiana, asociada a aumento de *Mycoplasmataceae* y *Spirochaetaceae* en detrimento de *Brevinemataceae*. Contrariamente, la microbiota de los peces que recibieron células probióticas inactivadas por calor mostró una disminución de *Mycoplasmataceae* y un aumento en la abundancia de *Brevinemataceae* y del género *Vibrio*. En general no hubo grandes diferencias entre SpPdp11 como probiótico vivo o

como paraprobiótico, modulando en ambos casos la microbiota intestinal sin comprometer el estado inmune intestinal de los peces.

En la búsqueda de nuevas formas de empleo de los probióticos que no impliquen el uso de células vivas de los microorganismos, se ha planteado el uso de productos derivados de los mismos.

Este planteamiento se consideró en la **Publicación 3**, en la que se estudió el potencial postbiótico de los productos extracelulares (ECP) de SpPdp11. El postbiótico se refiere al uso de componentes celulares o metabolitos bacterianos, incluidos los ECP. En la literatura científica está documentado que la producción de estos compuestos puede verse afectada por diversos factores, como las condiciones de cultivo, que son determinantes en el metabolismo bacteriano. Se planteó el estudio de los efectos de diferentes condiciones de cultivo, incluyendo modificaciones en los medios de cultivo (medio comercial, T; medio pienso, F y medio pienso suplementado con sal; FS), temperatura (23 °C o 15 °C) y tiempo (24 h o 48 h) de incubación. Los diferentes ECP obtenidos mostraron una amplia variedad de perfiles enzimáticos frente a compuestos nutricionales (caseína, gelatina y lípidos). Además, aunque no presentaron efecto antibacteriano frente a los patógenos piscícolas *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi* 16/00, *Vibrio anguillarum* CECT 522, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* CECT 626 y *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg 41/01, *Tenacibaculum maritimum* CECT 4296, *T. soleae* CECT 7292 y *T. gallaicum* CECT 7122 sí ejercieron interferencia en la formación de biofilm de determinados patógenos de peces como *V. anguillarum* CECT 522 y las tres cepas de *Tenacibaculum* mencionadas. También se observó un marcado efecto antivírico frente al virus de la necrosis nerviosa (NNV). Finalmente, se analizó el efecto citotóxico sobre diferentes líneas celulares de peces (DLB-1, FuB-1, PLHC-1 y SAF-1), observándose que la citotoxicidad mínima se observa en los ECP obtenidos a partir del cultivo en medio con pienso a 15 °C. En algunos casos los ECP incluso incrementaron los porcentajes de viabilidad de las células ensayadas. Esto demostró la influencia de las condiciones de cultivo en el potencial postbiótico de SpPdp11, que no se vio favorecido por el suplemento de sal (FS), mientras que el medio comercial (T) y el medio pienso (F) dieron lugar a resultados prometedores.

Este trabajo recogido en la publicación 3 permitió optimizar y considerar aquellas condiciones con las características más beneficiosas o bien elegir las condiciones más

adecuadas para potenciar actividades específicas para los estudios realizados posteriormente y presentados en la **Publicación 4**.

Además, se planteó el uso de otros sustratos como microalgas/cianobacterias para la obtención de los ECP. Así, el estudio del efecto de las condiciones de cultivo en el potencial postbiótico de los ECP de SpPdp11 plasmado en la **Publicación 4** incluye medio comercial (T) y medio pienso (F), con reemplazo parcial (FM) o total (M) de microalgas/cianobacterias como sustrato microbiano, así como variaciones en temperatura (23 °C y 15 °C) y tiempo (24 h y 48 h) de incubación. El uso de microalgas/cianobacterias como sustratos puede representar una estrategia valiosa para generar nuevos postbióticos con propiedades únicas. Los ECP evaluados también fueron analizados por su efecto citotóxico, capacidades hidrolíticas y antimicrobianas. Únicamente tres condiciones de ECP no fueron citotóxicas frente a las líneas celulares de peces analizadas. Los perfiles enzimáticos fueron variados, si bien los ECP obtenidos de medio FM hidrolizaron compuestos nutricionales clave (caseína, lípidos, amilasa y gelatina), mientras que los de medio M sólo hidrolizaron gelatina. Ninguna condición de ECP presentó efecto antibacteriano frente a los patógenos ensayados. Por último, se llevó a cabo un análisis proteómico de los ECP con mejores características, revelándose proteínas estructurales y reguladoras comunes, así como proteínas únicas asociadas al metabolismo de aminoácidos y capacidad antioxidante (FM2324 y FM1548) o sistema de quimiotáctico (M2324). De nuevo, los resultados destacan la influencia de las condiciones de cultivo en el potencial postbiótico de los ECP de SpPdp11, con especial énfasis en el sustrato.

Estos resultados abren paso a nuevas y futuras investigaciones como su uso en aditivos para piensos en ensayos *in vivo*, en el marco de una acuicultura sostenible. Sin embargo, los postbióticos no sólo pueden destacar en la industria alimentaria. En acuicultura se emplean también en el control de enfermedades y resistencia a patógenos. Uno de los patógenos más importantes en acuicultura marina es *P. damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*), cuyo principal factor de virulencia es la exotoxina Aip56 codificada en un plásmido y responsable de inducir apoptosis en leucocitos de peces. Estudios previos han informado que las células viables de SpPdp11 inhiben el crecimiento *in vitro* de *Phdp* cepa Lg 41/01, e *in vivo* aumentan la resistencia frente a dicho patógeno en diferentes especies de peces cultivados. Los ECP obtenidos de SpPdp11 no ejercieron

inhibición del crecimiento *in vitro* de *Phdp* en ningún caso; sin embargo, ello no implica que pueda descartarse alguna interferencia con factores de virulencia del patógeno como puede ser la producción de la toxina Aip56.

Por este motivo, la **Publicación 5** se centra en evaluar el efecto de los ECP, T2348-ECP y FM1548-ECP, obtenidos de SpPdp11 cultivada bajo diferentes condiciones de cultivo y que previamente demostraron ser no citotóxicos y ejercer actividades degradativas y de interferencia en la formación de biofilm de patógenos piscícolas. Se analizaron los efectos de estos ECP sobre la viabilidad, la apoptosis, el estallido respiratorio y la fagocitosis en leucocitos de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) inoculados con el sobrenadante de *Phdp*, que contenía la exotoxina Aip56. Ambos ECP, T2348-ECP y FM1548-ECP, carecieron de citotoxicidad para los leucocitos y redujeron significativamente su apoptosis en comparación con los leucocitos incubados con el sobrenadante de *Phdp*. A nivel de inmunidad mediada por células, el estallido respiratorio y la fagocitosis de los leucocitos se redujeron significativamente tras la incubación con el sobrenadante de *Phdp*, y no se vieron influenciados tras la incubación con T2348-ECP o FM1548-ECP. Sin embargo, ambas actividades se incrementaron significativamente después de la incubación de los leucocitos con los ECP T2348-ECP y FM1548-ECP combinados con el sobrenadante de *Phdp*, en comparación con los leucocitos incubados solo con el sobrenadante de *Phdp*. Esto último sugeriría que los ECP mejoran y aceleran la respuesta inmune de leucocitos en presencia de la toxina Aip56 contenida en el sobrenadante de *Phdp*. Este efecto se relacionó con la reducción significativa de la transcripción del gen que codifica la exotoxina Aip56, en las células del patógeno en presencia de los ECP T2348-ECP y FM1548-ECP. De esta forma, los ECP como potenciales postbióticos derivados de SpPdp11 presentarían un posible efecto antitoxigénico frente a *Phdp* y con ello un papel importante en el biocontrol de enfermedades en acuicultura.

ABSTRACT



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ABSTRACT

Probiotics are defined as live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the host. They act through various mechanisms, such as competitive exclusion of pathogens, production of antimicrobial substances, improvement of the intestinal barrier, and optimization of nutrient bioavailability, leading to a positive interaction with the intestinal microbiota. Probiotics stimulate innate and adaptive immunity, favouring intestinal colonization, the secretion of bioactive compounds and the production of different immune cells, contributing to the barrier function of the intestinal mucosa.

In the aquaculture sector, which is growing exponentially due to the high demand for animal protein by the population, probiotics have been shown to exert many of these beneficial effects such as reinforcing the intestinal barrier, improving digestibility and nutrient assimilation in feeds, and increasing disease resistance in cultured organisms. Thus, they offer an alternative to antibiotics, addressing associated problems such as bacterial resistance, environmental impacts or the presence of contaminants in the final product. However, probiotics, as viable cells, also present some limitations and risks, such as the potential transfer of antibiotic resistance or virulence genes or infections, especially in immunocompromised hosts.

Current regulations on the safety of probiotics show global differences, generating legal ambiguity. In the European Union, there are accepted and currently marketed probiotics that have gone through meticulous evaluation to ensure their safety. According to recommendations established by the International Probiotics and Prebiotics Association in 2019, a probiotic strain requires phenotypic and genotypic characterization, including genome sequencing and determining the presence of elements susceptible to horizontal transfer between microorganisms, such as virulence or antibiotic resistance genes, plasmids, or prophages. A probiotic must also demonstrate viability throughout its shelf life, ability to modulate the immune system, adhere to the gastrointestinal tract, and interact positively with the host microbiota.

The study conducted for over 20 years by our research group on the probiotic strain *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11), has shown that this microorganism meets many of the requirements associated with probiotics. SpPdp11 was isolated from the

skin of healthy gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and has been phenotypically characterized. Furthermore, it has shown to exert numerous beneficial effects in farmed fish, such as gilthead sea bream and Senegalese sole (*Solea senegalensis*). The administration of SpPdp11 as a live probiotic in the diet promotes fish growth, improves feed efficiency, and favourably modulates the intestinal microbiota, positively stimulating the immune system and intestinal health. At the genotypic level, the whole genome of SpPdp11 has been sequenced, and the presence of genes supporting its probiotic capacity has been determined. However, this genotypic characterization did not consider the presence of mobile elements such as plasmids, one requirements to consider a microorganism as a good probiotic candidate.

In this doctoral thesis, **Publication 1** focuses on the search for plasmids in different strains of *Shewanella putrefaciens*. These strains included the probiotic SpPdp11, five pathogenic strains (SH4, SH6, SH9, SH12, SH16), and two saprophytic strains (SdM1 and SdM2). Plasmids were found only in two of the five pathogenic strains (*pSH4* and *pSH12*) and not in the probiotic or in the two saprophytic strains analyzed. The characterization of the detected plasmids was carried out through a workflow that integrated Sanger sequencing, obtained by experimental plasmid extraction, and Illumina sequencing, obtained from the whole-genome sequencing of the plasmid-carrying strains. The workflow allowed obtaining the complete consensus sequences for both plasmids. Sequence analysis showed that these plasmids encoded a possible replication initiator protein of the RepB family, as well as proteins related to plasmid stability and a toxin-antitoxin system. This highlighted the implicatons of plasmid presence in the probiotic or pathogenic nature of *S. putrefaciens*, reinforcing the safety and probiotic character of SpPdp11.

However, concerns about the safety, applicability, and functionality associated with the viability of probiotics have led in recent years to search for safer and more effective alternatives, such as the use of biotic derivatives, including paraprobiotics and postbiotics. For this reason, the analysis of SpPdp11 as a paraprobiotic was proposed. Paraprobiotics are considered as "non-viable microbial intact cells or crude cell extracts (with a complex chemical composition), which when administered (orally or topically) in adequate amounts, confer a benefit to the human or animal host." This loss of viability is achieved by using inactivation methods. In this thesis, heat inactivation was used to

obtain SpPdp11 as a paraprobiotics, considered a safer alternative that could maintain the benefits associated with the live probiotics.

Publication 2 evaluates the administration of heat-inactivated SpPdp11 as a paraprobiotics in the diet of *S. senegalensis* specimens over 45 days, and its effect on microbiota and intestinal immunity, compared to the live probiotics. The fish that received the live probiotic showed significantly improved growth compared to the control. However, this did not occur after the administration of SpPdp11 asparaprobiotics. On the other hand, there were no differences in the transcription of genes associated with the intestinal immune system live or heat-inactivated SpPdp11 feeding. In both cases, the transcription of certain genes was modulated, decreasing the transcription of those associated with cellular stress (*hsp90ab* and *gp96*), and increasing those related to infection or damage (*cd4*, *cd8*, and *il-1 β*) and complement activity (*c3*). However, differences in the modulation of the intestinal microbiota were observed depending on the form of probiotic administration, live or heat-inactivated. Thus, viable cells led to greater microbial diversity, associated with increased *Mycoplasmataceae* and *Spirochaetaceae* at the expense of *Brevinemataceae*. Conversely, the microbiota from fish that received heat-inactivated probiotic cells showed a decrease in *Mycoplasmataceae* and increased abundance of *Brevinemataceae* and *Vibrio* genus. In general, there were no major differences between SpPdp11 as live probiotics or paraprobiotics, with both modulating the intestinal microbiota without compromising the immune status of the fish.

In the search for new ways to use probiotics that do not involve the use of live microbial cells, the use of derived products has been proposed.

This approach was considered in **Publication 3**, which focused on studying the postbiotic potential of extracellular products (ECPs) of SpPdp11. Postbiotics refer to the use of cellular components or bacterial metabolites, including ECPs. The scientific literature has documented that the production of these compounds can be affected by various factors, such as culture conditions, which are determinants in bacterial metabolism. Therefore, the study of the effects of different culture conditions on the postbiotic potential of the ECPs from SpPdp11 was proposed, including modifications in culture media (commercial medium, T; aquafeed medium, F; and aquafeed medium supplemented with NaCl; FS), temperature (23 °C or 15 °C), and incubation time (24 h

or 48 h). The different ECP obtained showed a wide variety of enzymatic profiles against nutritional compounds (casein, gelatin, and lipids). In addition, while no antibacterial effect was observed against fish pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi* 16/00, *Vibrio anguillarum* CECT 522, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* CECT 626 y *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg 41/01, *Tenacibaculum maritimum* CECT 4296, *T. soleae* CECT 7292 and *T. gallaicum* CECT 7122, the ECPs did interfere with biofilm formation by certain fish pathogens such as, *V. anguillarum* CECT 522 and the aforementioned strains of *Tenacibaculum*. A marked antiviral effect against the nervous necrosis virus (NNV) was also observed. Finally, the cytotoxic effect on different fish cell lines (DLB-1, FuB-1, PLHC-1 and SAF-1) was analyzed, and the minimum cytotoxicity was observed in the ECPs obtained from aquafeed culture medium at 15°C. In some cases, ECPs even increased cell viability percentages of the tested fish cell lines. These results demonstrated the influence of culture conditions on the postbiotic potential of SpPdp11, which was not enhanced by NaCl supplementation (FS), while commercial medium (T) and feed medium (F) yielded promising results.

This work summarized in **Publication 3** allowed the optimization and consideration of those conditions with the most beneficial characteristics, or the selection of the most suitable conditions to enhance specific activities for studies conducted later and presented in **Publication 4**.

Moreover, the use of other substrates such as microalgae/cyanobacteria for the production of ECPs was proposed. Thus, the study of the effect of culture conditions on the postbiotic potential of SpPdp11 ECPs, outlined in **Publication 4**, includes commercial medium (T) and aquafeed medium (F), with partial (FM) or total (M) replacement of microalgae/cyanobacteria as microbial substrate, as well as variations in temperature (23°C and 15°C) and incubation time (24 h and 48 h). The use of microalgae/cyanobacteria as substrates can represent a valuable strategy for generating new postbiotics with unique properties. The ECPs were analyzed for their cytotoxic effect, hydrolytic and antimicrobial activity. Only three ECP conditions were not cytotoxic to the assayed fish cell lines. The enzymatic profiles varied, with ECPs obtained from FM medium hydrolyzing key nutritional compounds (casein, lipids, amylase, and gelatin), while those from M medium only hydrolyzed gelatin. No ECP condition showed antibacterial effects against the tested pathogens. Finally, a proteomic

analysis of the ECP with the best characteristics was carried out, revealing common structural and regulatory proteins, as well as unique proteins associated with amino acid metabolism and antioxidant capability (FM2324 and FM1548) or chemotactic system (M2324). Again, the results obtained highlight the influence of culture conditions on the postbiotic potential of SpPdp11 ECP, with special emphasis on the substrate.

These results pave the way for new and future research, such as their use in feed additives in *in vivo* trials, within the framework of sustainable aquaculture. However, postbiotics are also used for disease control and pathogen resistance in aquaculture. One of the most important pathogens in marine aquaculture is *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Phdp), whose main virulence factor is the exotoxin Aip56 responsible for inducing apoptosis in fish leukocytes. Previous studies have reported that viable cells of SpPdp11 inhibit the *in vitro* growth of Phdp (strain Lg 41/01) and *in vivo* increase resistance to this pathogen in various cultured fish species. ECPs obtained from SpPdp11 did not inhibit *in vitro* growth of Phdp in any case; however, this does not rule out interference with virulence factors of the pathogen, such as the production of Aip56 toxin.

For this reason, **Publication 5** focuses on evaluating the effects of ECPs, T2348-ECP and FM1548-ECP, obtained from SpPdp11 cultured under different conditions, and previously shown to be non-cytotoxic and to exert hydrolytic activities and interference in biofilm formation by fish pathogens. The effects of ECPs were analyzed for their on viability, apoptosis, respiratory burst, and phagocytosis European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head kidney leukocytes (HKLs) inoculated with Phdp supernatants containing Aip56 exotoxin. Both ECPs, T2348-ECP and FM1548-ECP, were not cytotoxic for HKLs and significantly reduced their apoptosis compared to leukocytes incubated with the Phdp supernatant. In terms of cell-mediated immunity, respiratory burst and phagocytosis of leukocytes were significantly reduced after incubation with Phdp supernatant and not affected by incubation with T2348-ECP or FM1548-ECP alone. However, both activities were significantly increased when T2348-ECP and FM1548-ECP were added to leukocytes incubated with Phdp supernatant, compared to HKLs incubated only with Phdp supernatant. This would suggest that the ECPs enhance and accelerate the immune response of HKLs in the presence of the toxin Aip56. This effect was associated with a significantly reduction in the transcription of

the gene encoding the exotoxin Aip56 in the pathogen inoculated with, T2348-ECP and FM1548 ECP-. Thus, ECPs as potential postbiotics derived from SpPdp11, would present a possible antitoxigenic effect against *Phdp* and thereby play an important role in biocontrol of diseases in aquaculture.

INTRODUCCIÓN GENERAL Y ESTADO DEL ARTE



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. INTRODUCCIÓN GENERAL Y ESTADO DEL ARTE

1. Probióticos

1.1. Definición de probiótico

El concepto de probiótico ha sufrido diversas modificaciones a lo largo de los años, considerándose cuestiones como la viabilidad del microorganismo (Fuller, 1989), la presencia de los mismos en productos lácteos o no lácteos (Salminen y von Wright, 1998), así como su efecto en la salud y la microbiota intestinal del hospedador (Schrezenmeir y de Vrese, 2001). No fue hasta 2002 cuando la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) propusieron la definición de probiótico como, “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador”. Posteriormente, Hill et al. (2014) señalaron que los probióticos deben presentar contenidos definidos, evidencias de su vida útil y beneficios para la salud, y afirmaron, además, que todos los probióticos deben ser seguros para el uso previsto. Estos puntos fueron reiterados y perfeccionados en 2014 por la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP), una organización compuesta por expertos en Microbiología, Nutrición y Fisiología gastrointestinal, que participaron y participan en las últimas actualizaciones sobre la definición y el uso de probióticos (Swanson et al., 2020). La ISAPP aceptó y adoptó la definición y los criterios propuestos para el término “probiótico” por la FAO/OMS en 2002 y Hill et al. (2014), siendo ampliamente utilizado por la comunidad científica, y considerado como criterio aplicado a medicamentos, alimentos y suplementos como probióticos en la mayoría de las instituciones gubernamentales (Zendeboodi et al., 2020). Aclarar los criterios mínimos necesarios para el uso adecuado del término probiótico es especialmente útil en un momento en el que se están introduciendo nuevos nombres bióticos en el lenguaje, como los términos farmacobiótico, psicobiótico o simbiótico, entre otros (Binda et al., 2020). En este sentido, en la definición de probiótico se presume la viabilidad como uno de los factores cruciales para considerar a un microorganismo como probiótico (Binda et al., 2020), hecho que coincide con el origen de su nombre, que proviene del latín *pro* y del griego *biōtikós*, que etimológicamente significa “para la vida” (Ji et al., 2023).

1.2. Criterios para considerar a un microorganismo como probiótico

Los probióticos se emplean tanto como suplementos en la alimentación como en entornos clínicos, abarcando un amplio rango de consumidores, lo que implica posibles efectos adversos que deben estar controlados. Por ello, el estudio, desarrollo y aplicación de cepas potencialmente probióticas requiere recomendaciones específicas y prácticas sobre el uso seguro, responsable y eficaz de los probióticos (Merenstein et al., 2023). Así, la ISAPP en 2019 establece que una cepa probiótica debe: (i) estar suficientemente caracterizada; (ii) ser segura para el uso previsto; (iii) estar respaldada por al menos un ensayo clínico positivo en humanos, realizado de acuerdo con estándares científicos generalmente aceptados, o según las recomendaciones y disposiciones de las autoridades locales/nacionales cuando corresponda; y (iv) estar viva en el producto en una dosis eficaz durante toda su vida útil (Swanson et al., 2020). Del mismo modo, discute y emite recomendaciones para guiar a la comunidad científica y médica a la hora de juzgar la seguridad y caracterización de los probióticos.

De esta forma, para considerar a un microorganismo probiótico como buen candidato, actualmente se integran datos fenotípicos y genotípicos (Donelli et al., 2013). La caracterización fenotípica de las cepas probióticas se basa en los datos proporcionados por todos los métodos de tipificación basados en características morfológicas, culturales y fisiológicas, como forma de la célula, de las colonias, temperatura de crecimiento, concentración de sales o requerimiento de oxígeno, entre otras, y que pueden proporcionar información sobre los constituyentes químicos de las células microbianas (Lawson y Patel, 2021). Por tanto, las pruebas fenotípicas clásicas son una fuente importante de información para una descripción preliminar de los taxones. Además, a nivel genotípico se enfatiza la importancia de la secuenciación del genoma completo y elementos extra cromosómicos si los hubiera, como la presencia de plásmidos y profagos, pues su ausencia se suele considerar un factor positivo adicional en cuanto a los candidatos probióticos, por ser considerados potenciales vectores de genes de virulencia, toxinas y resistencia a antibióticos (Contente et al., 2024). En cualquier caso, la correcta determinación de estos elementos en los microorganismos permite una asignación clara de la identidad de especies y cepas, y de su seguridad (Swanson et al., 2020). También se debe dar especial énfasis a propiedades como la capacidad de transferencia de genes, translocación, posibilidad de afectar la función de los fármacos y la producción de metabolitos (Merenstein et al., 2023).

Del mismo modo, se considera la capacidad del probiótico para modular el sistema inmune y su efecto sobre el tracto gastrointestinal del hospedador, mostrando en este último la capacidad de competir, adherirse, persistir y sobrevivir a las condiciones del mismo, así como interactuar positivamente con la microbiota autóctona del hospedador (Mazziotta et al., 2023).

1.3. Mecanismos de acción de los probióticos

Los mecanismos de acción de los probióticos son diversos, teniendo efectos beneficiosos muy variados, dada la naturaleza y la diversidad de los efectores moleculares que intervienen. Estos efectores participan en una compleja interacción entre la microbiota intestinal, el sistema inmune intestinal y las células epiteliales, y consisten principalmente en proteínas y péptidos de diferente naturaleza, bien localizadas en la superficie microbiana o proteínas secretadas extracelularmente; componentes del peptidoglicano; polisacáridos capsulares o exopolisacáridos; pili o fimbrias; y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) o ramificada (AGCL) (Daliri et al. 2021; Gao et al., 2022; Vera-Santander et al., 2023; Bhawal et al., 2023).

Los probióticos actúan mediante una serie de mecanismos (**Figura 1**) que incluyen (i) la exclusión competitiva de patógenos por competición por los nutrientes y sitios de unión a receptores, lo que dificulta la supervivencia de estos patógenos en el intestino (Plaza-Díaz et al., 2019); (ii) disminución de la presencia de microorganismos patógenos en el intestino mediante la producción de sustancias antimicrobianas tales como AGCC, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno o bacteriocinas (Fantinato et al., 2019; Ahire et al., 2021); (iii) mejora de las funciones de la barrera intestinal al estimular la producción de mucina (Chang et al., 2021) o regulando la expresión de proteínas de las uniones estrechas, incluidas la ocludina y la claudina, entre otras (Rose et al., 2021) y (iv) aumento de la biodisponibilidad de ciertos componentes naturales o metabólicos y nutrientes esenciales (Vera-Santander et al., 2023), favoreciendo la digestibilidad y asimilación de nutrientes, y pudiendo disminuir la intolerancia alimentaria en hospedadores susceptibles e interactuando positivamente con la microbiota intestinal (Karani et al., 2023; Daliri et al., 2021).

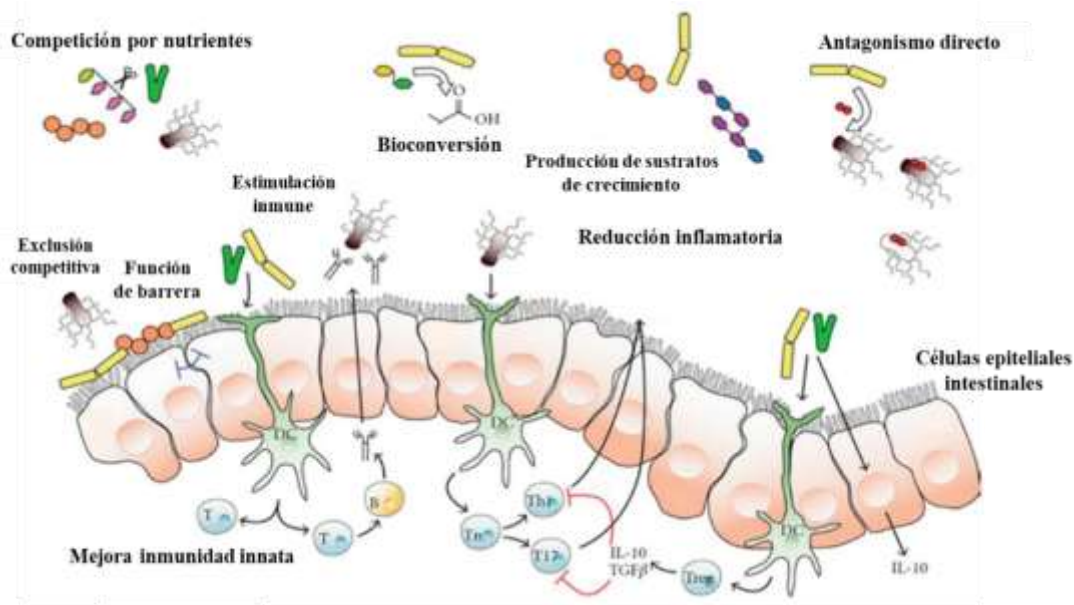


Figura 1. Modos de acción de los probióticos (Fuente: Swain et al., 2023).

Igualmente, a nivel de sistema inmune, los probióticos pueden mejorar la respuesta inmune innata y adaptativa en el intestino (Tegegne al., 2022). La inmunidad innata supone la primera línea de defensa inespecífica contra agentes externos. Generalmente incluye barreras físicas/químicas, como la piel y las mucosas. En este sentido, el efecto de las bacterias probióticas sobre la inmunidad se ejerce en primer lugar, mediante la colonización epitelial, con la inducción simultánea de la secreción de mucina y la producción de diversos compuestos bioactivos (Yeşilyurt et al., 2021). También favorece la producción de células inmunes como las células dendríticas (CD), monocitos, macrófagos, neutrófilos y células *natural killer* (NK), entre otras (Thoda y Touraki, 2023). El efecto de los probióticos es aumentar la cantidad de estas células en la lámina propia, la capa subyacente al epitelio intestinal, mejorando su función y favoreciendo la tolerancia y la homeostasis intestinal (Wang et al., 2021).

La inmunidad adaptativa/adquirida puede verse como una segunda línea de defensa específica que incluye a los linfocitos, es decir, las células B y T, cuya maduración y diferenciación es promovida por los probióticos (Thoda y Touraki, 2023). Estas células participan en respuestas mediadas por anticuerpos mediante la producción de inmunoglobulinas (Ig), especialmente IgA, que migran a través del epitelio mucoso y controlan la adhesión de microorganismos (Mazziota et al., 2023). En resumen, los

mecanismos de inmunomodulación derivados de los probióticos incluyen principalmente (i) activación de macrófagos; (ii) maduración y estimulación de células productoras de IgA y neutrófilos; (iii) estimulación periférica de la producción de Ig; (iv) estimulación de la producción de mucinas e (v) inhibición de la liberación de citoquinas proinflamatorias (Cristofori et al., 2021; Thoda y Touraki, 2023).

1.4. Probióticos en acuicultura

La acuicultura es el sector agroindustrial de más rápido crecimiento, y supone una importante fuente de proteínas en la alimentación humana (FAO, 2022). En los sistemas de acuicultura intensiva los peces de cultivo están sujetos a condiciones como las altas densidades de población en las granjas y la alta incidencia de patógenos, que afectan negativamente a su sistema inmunitario (Martos-Sitcha et al., 2020). Las formas más frecuentes de combatir las infecciones han sido los agentes químicos y los antibióticos. Sin embargo, en los últimos años el uso de estos tratamientos ha sido cuestionado y restringido, especialmente la administración de antibióticos, debido a sus efectos bioacumulativos y al aumento de resistencias bacterianas, con consecuencias perjudiciales para la salud humana y animal (Torres-Maravilla et al., 2024).

Por ello, la investigación ha explorado otros campos, y se ha dirigido al desarrollo de vacunas e inmunoestimulantes como mecanismos para prevenir infecciones. Pese a que las vacunas son una herramienta muy valiosa para la prevención de enfermedades infecciosas, su desarrollo en la práctica acuícola no siempre es posible, dada la dificultad de su administración, el coste económico de su desarrollo, la necesidad de contar con personal especializado para su aplicación y la escasez de vacunas disponibles frente a los numerosos patógenos acuícolas que existen (Mondal y Thomas, 2022).

Otro campo bien investigado es el de los probióticos, que representan una alternativa interesante no sólo para reducir la susceptibilidad de los peces a las enfermedades, sino como suplementos dietéticos. Estos suplementos pueden favorecer la digestibilidad, la asimilación de nutrientes en el hospedador y reforzar la barrera intestinal. Por ello, los probióticos se plantean actualmente como alternativas prometedoras a un uso excesivo de antibióticos en el marco de una actividad acuícola respetuosa con el medio ambiente (Cerezo et al., 2022).

Algunos de los candidatos probióticos más estudiados incluyen bacterias ácido lácticas (BAL) como *Lactobacillus* sp. o bien géneros como *Bacillus*, *Vibrio* y *Enterococcus*, y levaduras como *Sacharomyces* sp. (Cerezo et al., 2022). En muchos casos estos organismos no proceden del entorno en el que viven los animales acuáticos, por lo que su adaptación y colonización en el hospedador se ve dificultada. El uso de probióticos procedentes de los ambientes acuáticos resulta prometedor, ya que ofrecen una estrategia alternativa dentro de la acuicultura (Van Doan et al., 2019). Son muchos los probióticos que se investigan en acuicultura y que generan efectos beneficiosos en el hospedador acuícola, como refleja la **Tabla 1**.

Tabla 1. Ejemplos de probióticos empleados en acuicultura.

Probiótico	Método de aplicación	Dosis	Tiempo de administración	Especie cultivada	Efecto en el hospedador	Ref.
<i>Bacillus subtilis</i>	Suplemento en la dieta	1×10^8 UFC/g	6 semanas	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Mejora la microbiota intestinal, presenta un efecto inmunomodulador, promueve el crecimiento y la resistencia a enfermedades	Shija et al., 2023
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Baño	7×10^9 UFC/g	56 días	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Promueve el crecimiento, asimilación de nutrientes, hematología, expresión génica inmune y resistencia a enfermedades	Hendam et al., 2023
<i>Lactococcus lactis</i>	Suplemento en la dieta	2×10^9 UFC/kg y 5×10^9 UFC/kg	12 semanas	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Mejora la expresión de genes relacionados con la inmunidad adquirida y modula la microbiota intestinal	Moroni et al., 2021
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Suplemento en la dieta	1, 2 y 4 g/kg	16 semanas	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Promueve el crecimiento, mejora la morfología intestinal, favorece la homeostasis intestinal y la respuesta inmune	El-Bab et al., 2022
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Suplemento en la dieta	2, 2.5 y 3 g/kg	60 días	Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.)	Mejora la calidad del agua, promueve el crecimiento, la fisiología y la supervivencia, los marcadores bioquímicos en sangre y la histología intestinal	Eissa et al., 2022

<i>Weissella confusa</i>	Suplemento en la dieta	1.5×10^7 , 3×10^7 y 4.5×10^7 UFC/g	2 meses	Trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Promueve el crecimiento y mejora los niveles de bacterias acidolácticas en el intestino. Efecto inmunomodulador (<i>tnf-α</i> y <i>il-10</i>)	Kahyani et al., 2021
<i>Bacillus coagulans</i>	Suplemento en la dieta	1×10^7 , 2×10^7 y 4×10^7 UFC/g	45 días	Trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Promueve el crecimiento, la calidad del filete e induce una modulación positiva de la respuesta inmune	Xu et al., 2014
<i>Enterococcus faecium</i>	Suplemento en la dieta	10^{10} UFC/g	14 días	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Protege mejorando el estallido respiratorio frente a <i>Aeromonas hydrophila</i> , promueve el crecimiento y refuerza el sistema inmune	Tachibana et al., 2020
<i>Enterococcus casseliflavus</i> EC-001	Suplemento en la dieta	1×10^8 y 10^9 UFC/g	8 semanas	Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	Promueve el crecimiento y refuerza el sistema inmune y la resistencia a enfermedades	Akbari et al., 2021
<i>Shewanella</i> sp. MR-7	Suplemento en la dieta	10^6 , 10^7 y 10^8 UFC/g	8 semanas	Gamba blanca (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Promueve crecimiento y ganancia de peso, induce la expresión de genes relacionados con el sistema inmune y modula positivamente la microbiota intestinal	Wei et al., 2021

1.5. Limitaciones en el uso de probióticos

Aunque el uso de probióticos está asociado a beneficios en el hospedador, hay que tener en cuenta que emplear células vivas puede tener efectos adversos en algunos casos (Zucko et al., 2020). Por ejemplo, se ha determinado que los probióticos pueden modular el sistema inmune; sin embargo, la administración de células probióticas vivas a un hospedador con un sistema inmune comprometido puede aumentar las respuestas inflamatorias (Kothari et al., 2019). Además, en muchos casos es difícil asegurar la supervivencia microbiana en una cantidad suficiente durante toda la vida útil del preparado probiótico (Fenster et al., 2019). Los probióticos también pueden causar efectos perjudiciales y representar riesgo de actividades metabólicas nocivas y de transferencia de genes a otros microorganismos (Van den Nieuwboer et al., 2015).

También existe la posibilidad de que un probiótico, como microorganismo viable, pueda causar una infección, siendo las infecciones sistémicas oportunistas una de las preocupaciones más importantes (Sharma et al., 2023). El potencial de adhesión de estas cepas a la mucosa intestinal y la posterior colonización se consideran pasos importantes para la patogenicidad porque pueden prolongar la persistencia en el intestino e implicar una bacteriemia (Katkowska et al., 2016). Además, en determinadas circunstancias, como la inmunosupresión, o casos en los que se altera la permeabilidad intestinal, estas bacterias que pasan a formar parte de la microbiota del hospedador pueden cruzar la barrera intestinal y entrar en el torrente sanguíneo mediante difusión pasiva o cualquier procedimiento invasivo en el intestino, causando infección (Zucko et al., 2020). Por lo tanto, los probióticos deben ser extremadamente seguros y no representar ningún riesgo para el hospedador, y de ahí que requieran una minuciosa evaluación y regulación de su uso antes de su aplicación.

Dado que la categorización mundial actual de los probióticos y las medidas de regulación son relativamente amplias, se genera ambigüedad legal. Al diseñar políticas o regulaciones para los probióticos, se deben tener en cuenta matices sobre el desarrollo, fabricación, investigación y aplicación de cada probiótico, que actualmente no son universales y no siempre son evidentes (Arora y Baldi, 2015). Aunque puede haber un acuerdo general entre las autoridades reguladoras globales sobre los principios básicos de seguridad que deben establecerse para los probióticos, hay poco consenso sobre los tipos de estudios y métodos para confirmar dicha seguridad. Por lo tanto, es difícil proporcionar

una lista completa de técnicas y métodos específicos que cumplan con los requisitos reguladores globales de cada país. Así, los mercados pueden ser significativamente diferentes en cuanto a legislación, posibles declaraciones, valor de mercado y requisitos de calidad para el desarrollo y comercialización de productos probióticos. La prueba está en la multitud de organizaciones que abordan documentos de orientación reglamentaria e iniciativas en cuanto a la seguridad y aceptación de los probióticos, y las variaciones entre ellas. Algunas de estas organizaciones incluyen la Presunción Cualificada de Seguridad (QPS) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (EFSA, 2024), la Federación Internacional de Lácteos (IDF) (Bourdichon et al., 2022), la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos (EEUU) sobre alimentos generalmente reconocidos como seguros (GRAS) y la notificación de nuevos ingredientes dietéticos (NDI) (Garg et al., 2024), la monografía de probióticos de Health Canada (Boyte et al., 2025) y las pautas de la Asociación Internacional de Probióticos (IPA) (Szajewska et al., 2024), entre otras.

1.5.1. Legislación en la Unión Europea (UE)

La legislación europea vigente queda recogida en el Reglamento (UE) 2015/2283 relativo a los nuevos alimentos y tiene como objetivo establecer una normativa para su comercialización con un elevado nivel de protección de la salud de los seres humanos, los animales y el medio ambiente, así como de los intereses de los consumidores en el mercado de la Unión Europea. De esta forma se establece la lista QPS de microorganismos, resultado de una preevaluación en la que los expertos consideran la identidad taxonómica del microorganismo, el cuerpo de conocimientos relacionado y los posibles problemas de seguridad. Esta QPS, desarrollada por el Comité Científico de la EFSA, se estableció oficialmente por primera vez en 2007 y desde entonces se revisa y actualiza continuamente. Se aplica para proporcionar un concepto genérico para la evaluación de riesgos relacionados con los microorganismos introducidos intencionalmente en las cadenas alimentaria y animal, así como la decisión sobre las autorizaciones de comercialización para su uso en alimentos y piensos (EFSA, 2024).

El establecimiento de un estatus QPS se basa en cuatro pilares fundamentales: (i) la unidad taxonómica (UT) para la cual se busca QPS (“identificación taxonómica”); (ii) si se dispone de suficiente información relevante sobre la UT propuesta que permita llegar a conclusiones sobre una exposición humana/animal a través de alimentos/piensos

(“conjunto de conocimientos”); (iii) si la UT propuesta contiene “preocupaciones de seguridad” conocidas y, finalmente, (iv) el uso final previsto (EFSA, 2024). De esta forma, tanto si se tratan riesgos de salud humana o animal, la EFSA evalúa la toxicidad, capacidad de infectar, alergenicidad y resistencia a antibióticos en los diferentes microorganismos. Por lo tanto, esto último incluiría el estudio de la presencia de plásmidos como posibles vectores de genes de resistencia a antibióticos, como se ha mencionado anteriormente. En cualquier caso, según los últimos datos proporcionados por la EFSA (hasta julio de 2024), el número de bacterias aceptadas con estatus QPS es 61, y podemos encontrar géneros como: *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Escherichia*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium* o *Streptococcus*, entre otros.

De los géneros bacterianos mencionados anteriormente, muchos se encuentran incluidos en la lista QPS como aditivos zootécnicos, siendo algunos de ellos empleados en el sector acuícola (EFSA, 2024). Por ejemplo, el producto comercializado Bactocell® procede de la cepa *Pediococcus acidilactici* CNCM I-4622, y la EFSA ha dictaminado su seguridad y eficacia para su empleo en piensos para especies acuícolas como salmónidos, camarones y otros peces (EFSA, 2012a). Sin embargo, la lista de bacterias aceptadas no incluye el género *Shewanella*, al menos hasta el momento.

El género *Shewanella* presenta una amplia distribución en los ecosistemas, pero se suele asociar sobre todo a ambientes marinos (Lemaire et al., 2020). Aunque algunas especies se consideran patógenas (Yu et al., 2022), otras presentan interesantes aplicaciones biotecnológicas, especialmente asociadas a la biorremediación y biodegradación, por su capacidad para resistir y detoxificar una amplia gama de compuestos tóxicos (Olivier et al., 2020). Por otro lado, también podemos encontrar especies potencialmente probióticas, como es el caso de la cepa *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11), objeto de estudio en la presente tesis doctoral y que ha sido ampliamente estudiada como potencial probiótico en acuicultura (Cámara-Ruiz et al., 2020).

1.6. *Shewanella* Pdp11 (SpPdp11) como probiótico

Esta tesis se centra en el probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11), una bacteria gram negativa aislada de piel de dorada (*Sparus aurata*) sana (Chabrillón et al., 2005a). Una primera caracterización *in vitro* demostró que SpPdp11 presentaba una alta

capacidad de adhesión a la piel y la mucosa intestinal de dorada (*S. aurata*) y lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), y un efecto antagonista frente a los patógenos piscícolas *Vibrio harveyi*, *Listonella anguillarum* y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, reduciendo la adhesión de los mismos al mucus y la piel de lenguado senegalés y dorada (Chabrállón et al., 2005b; 2006; Díaz-Rosales et al., 2009). En cuanto a la evaluación del potencial *in vivo* de SpPdp11, la administración oral del probiótico vivo a ejemplares de lenguado senegalés, seguida de una infección experimental con una cepa del patógeno *V. harveyi*, redujo la mortalidad de los peces que recibieron la dieta suplementada con SpPdp11 de forma significativa en comparación con los peces alimentados con una dieta control (Chabrállón et al., 2005b). En dorada se observaron resultados similares tras infección experimental con el patógeno *L. anguillarum* (Chabrállón et al., 2006) y posteriormente en lenguado senegalés frente al patógeno *P. damsela* subsp. *piscicida* (de la Banda et al., 2012).

Estos efectos beneficiosos dieron lugar a su depósito en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) donde actualmente se encuentra disponible bajo la referencia *Shewanella putrefaciens* Pdp11 CECT 7627. Posteriormente, numerosos estudios a lo largo de los años han seguido demostrando que SpPdp11 es un buen candidato como probiótico a ser aplicado en especies de cultivo como el lenguado senegalés y la dorada. La administración dietética de células vivas de SpPdp11 promueve el crecimiento y mejora la eficiencia de utilización del alimento (Sáenz de Rodrigáñez et al., 2009; de la Banda et al., 2010; Lobo et al., 2014) y estimula el sistema inmunitario y la funcionalidad intestinal en dorada (Sáenz de Rodrigáñez et al., 2009; Cordero et al., 2015) y lenguado senegalés (Tapia-Paniagua et al., 2010). Este efecto se manifiesta también en larvas y juveniles de lenguado senegalés, donde además se ha observado una disminución de especies de *Vibrio*, y un aumento de especies de *Lactobacillus* en la microbiota intestinal (Tapia-Paniagua et al., 2014; 2015). Por lo tanto, SpPdp11 es capaz de modular la microbiota y aumentar la variabilidad genética de las comunidades microbianas intestinales en lenguado senegalés, reduciendo además en éste último los efectos negativos derivados del tratamiento con oxitetraciclina, e induciendo la expresión de genes relacionados con efectos antiapoptóticos y con la regulación del estrés oxidativo (Tapia-Paniagua et al., 2015). A nivel intestinal, se ha observado un aumento en las células caliciformes (Tapia-Paniagua et al., 2014) y una disminución de gotas lipídicas en enterocitos y hepatocitos de lenguado senegalés (de la Banda et al., 2010; Tapia-Paniagua

et al., 2012). Esto se traduce en una mejora en las tasas de crecimiento y ganancia de peso, como se ha mencionado anteriormente, disminuyendo la dispersión en el peso de los ejemplares en ensayos *in vivo* con dorada y lenguado senegalés. En estos mismos peces también se observan efectos relacionados con actividades enzimáticas relacionadas con la nutrición, así como genes relacionados con funciones metabólicas (Jurado et al., 2018). Todo esto contribuye al mantenimiento de la homeostasis intestinal y, por tanto, al bienestar de los peces.

Con respecto a la inmunidad y la tolerancia al estrés, se ha mencionado anteriormente que SpPdp11 aumenta la resistencia frente a bacterias patógenas como *V. harveyi* y *P. damsela* subsp. *piscicida* en lenguado senegalés y dorada. En ensayos en los que ambas especies de peces cultivados se someten a un estrés por una alta densidad de población (Tapia-Paniagua et al., 2014), la administración del probiótico vivo aumenta las actividades peroxidasa, estallido respiratorio y fagocitosis en leucocitos de riñón cefálico en lenguado (Vidal et al., 2016) y dorada (Cordero et al., 2016), respectivamente. Además, ejerce una modulación de genes relacionados con la inmunidad y la respuesta al estrés en ambas especies (Cordero et al., 2016; Jurado et al., 2018). Mientras los efectos descritos se observan tras la administración del probiótico vivo, normalmente encapsulado en alginato de sodio, otros estudios valoran el efecto probiótico en dietas combinadas. Por ejemplo, la administración combinada en la dieta de SpPdp11 con β -glucanos (β -1,3/1,6-glucano) en dorada moduló positivamente la respuesta inmune y estimuló el crecimiento de los peces (Guzmán-Villanueva et al., 2014). La combinación de SpPdp11 con extracto de fruto de palma (Guardiola et al., 2016) en especímenes de lubina (*Dicentrarchus labrax*), aumentó la capacidad fagocítica, el estallido respiratorio y moduló beneficiosamente la expresión de genes relacionados con el sistema inmune. Además, se ha podido demostrar que en especímenes de dorada a las que se les provoca una herida en la piel, la cicatrización de la misma se ve favorecida en los individuos que han recibido probiótico vivo por vía oral (Chen et al., 2020), modulando, además, la microbiota de la piel en detrimento de bacterias relacionadas con la formación de biofilm, y sobreexpresando genes relacionados con la proliferación y la migración celular (Cerezo et al., 2023).

A nivel molecular, el genoma completo de SpPdp11 ha sido secuenciado, ensamblado y depositado en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica

(NCBI) bajo el número de acceso CP015194 (Seoane et al., 2019). Además, un flujo de trabajo denominado TarsynFlow (*Targeted Synteny Workflow*) demostró que SpPdp11 presenta un clúster de genes específicos que apoyan su marcado carácter probiótico, y que incluye genes que codifican factores para la colonización del intestino, resistencia a sales biliares e inhibición de la adhesión de patógenos en el intestino, entre otras (Seoane et al., 2019).

No obstante, a pesar de los múltiples efectos beneficiosos asociados a SpPdp11, ante la dificultad que supone la inclusión y aceptación de los probióticos y su regulación legal, como se ha descrito anteriormente, se ha ampliado la forma de utilizar los probióticos en los últimos años, dando lugar a nuevas definiciones relacionadas con la terminología probiótica y al empleo de los denominados derivados bióticos.

2. Derivados bióticos: paraprobióticos y postbióticos

El concepto de probiótico lleva implícito la viabilidad de las células bacterianas, suponiendo una condición esencial para asegurar los efectos beneficiosos derivados para la salud del hospedador. Sin embargo, investigaciones más recientes han reconocido mecanismos y beneficios en el hospedador por parte de derivados de los probióticos que no implican el uso de microorganismos vivos (Yan et al., 2024). Así, se han desarrollado nuevos conceptos derivados de los probióticos, conocidos como otros bióticos. Algunas de las estrategias empleadas son los paraprobióticos y los postbióticos, objeto de estudio en esta tesis doctoral.

El término paraprobiótico fue acuñado por Tavernity y Guglielmetti, (2011) quienes lo definieron como “células microbianas no viables intactas o extractos crudos de células (con una composición química compleja), que cuando se administran (por vía oral o tópica) en cantidades adecuadas, confieren un beneficio al hospedador humano o animal”. Esta definición es similar a la propuesta por la ISAPP, (2019) para el término postbiótico definido como una “preparación de microorganismos inanimados y/o sus componentes que confiere un beneficio para la salud del hospedador”.

En los últimos años, se han empleado multitud de términos en relación al uso de microorganismos no viables o sustancias derivadas de los mismos que, de algún modo, preservan o mejoran la salud del hospedador (Salminen et al., 2021a). El hecho de que diferentes términos se emplearan para definir conceptos similares ha llevado a la ISAPP,

(2021) a proponer una definición consenso que recoja de forma conjunta tanto las células completas no viables como las sustancias derivadas. El término propuesto y que englobaría todo ello sería el de postbiótico, de forma que lo que hasta entonces se conocía como paraprobiótico pasaría, según esta propuesta, a ser denominado también como postbiótico. No obstante, aún no se ha acabado de adoptar esta recomendación y en la literatura científica siguen encontrándose ambos términos.

En esta tesis doctoral se mantendrán las dos terminologías. El uso de paraprobiótico, como microorganismo probiótico no viable, empleado en este trabajo, se ajustaba a la terminología empleada antes de las recomendaciones emitidas por la ISAPP en 2021. Por su parte, el término postbiótico, como componentes derivados de un microorganismo probiótico vivo, se ajusta a la terminología actual recomendada.

2.1. Paraprobióticos

Los paraprobióticos se han descrito bajo términos distintos tales como probióticos inactivados, probióticos fantasma o probióticos no viables (Siciliano et al., 2021). Sin embargo, todas estas expresiones se definen resumidamente como células microbianas inactivadas (no viables) que, cuando se utilizan en cantidades suficientes, presentan beneficios para los consumidores (Aguilar-Toalá et al., 2018).

Los paraprobióticos se obtienen a partir de microorganismos cuyas células se han sometido previamente a un tratamiento como puede ser: tratamiento térmico, alta presión, irradiación, radiación ultravioleta (UV), campo eléctrico pulsado, secado, sonicación, y cambios de pH entre otros (Lee et al., 2023). De todos ellos, la inactivación por calor, aplicando calor o altas temperaturas durante un periodo de tiempo determinado, es el método más comúnmente utilizado (Choudhury y Kamilya, 2019). Este es actualmente un método que se sigue llevando a cabo, puesto que es una técnica bien estandarizada y que supone un bajo coste (Mudaliar et al., 2024). Los diferentes métodos de inactivación afectan a la envoltura y membrana celular, ácidos nucleicos, provocan desnaturalización de proteínas, cambios químicos, inactivación de enzimas y coagulación de proteínas (Lee et al., 2023). Después de esta inactivación, la ausencia de viabilidad celular se confirma mediante siembra en placa en medios de cultivo adecuados, sugiriéndose la complementación con análisis de citometría de flujo para determinar la integridad de la membrana y la posible liberación o no de contenido celular (Yolmeh et al., 2024). Esta

comprobación es necesaria dado que las células dañadas aún pueden mantener una actividad metabólica residual (Lee et al., 2023).

La inactivación permite emplear a los paraprobióticos en dos formas: intactos y rotos. Los primeros comprenden células microbianas inactivadas intactas, en tanto que los segundos son fracciones o extractos celulares que incluyen peptidoglicanos, ácidos teicoicos, polisacáridos de la pared celular, proteínas asociadas a la superficie celular y filamentos proteicos entre otros (Aguilar-Toalá et al., 2018). A pesar de las recomendaciones establecidas por la ISAPP en 2021, son muchos los estudios que siguen empleando el término paraprobiótico para referirse al empleo de un microorganismo no viable previamente sometido a un tratamiento de inactivación. Algunos ejemplos de paraprobióticos recientemente empleados en acuicultura que han demostrado ejercer efectos beneficiosos en el hospedador se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Ejemplos de paraprobióticos empleados en acuicultura.

Paraprobiótico	Método inactivación	Dosis	Tiempo de administración	Especie cultivada	Efecto en el hospedador	Ref.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> COFCAU_P1	Calor y formalina	10 ⁶ , 10 ⁷ , and 10 ⁸ UFC/g	30 días	Pez rohu (<i>Labeo rohita</i>)	Induce la respuesta inmune <i>in vitro</i> e inmunidad innata y aumenta la resistencia frente a <i>Aeromonas hydrophila</i>	Barui et al., 2023
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> L-137	Calor	2×10 ¹¹ UFC/g	61 días	Salmón atlántico (<i>Salmo salar</i>)	Refuerza la barrera intestinal, modula el sistema inmune y la respuesta fisiológica	Rocha et al., 2023
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FPTB16	Calor	10 ⁷ , 10 ⁸ and 10 ⁹ UFC/g	4 semanas	Carpa (<i>Catla catla</i>)	Mejora parámetros bioquímicos (actividad fosfatasa alcalina, glucosa y transaminasas) y la expresión de genes inmunes (<i>il-1β</i> , <i>tnf-α</i> y <i>c3</i>)	Singh et al., 2017
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Calor	1, 2 y 4 g/kg	4 semanas	Dorada (<i>Sparus aurata</i> L.)	Mejora la recuperación de heridas en la piel, reducción de la inflamación y el estrés	Espinosa y Esteban, 2020
<i>Clostridium butyricum</i> CBG01	Calor y sonicación	10 ¹¹ UFC/kg	42 días	Gamba blanca (<i>Penaeus vannamei</i>)	Mejora el crecimiento, la inmunidad y la resistencia a enfermedades	Luo et al., 2021

<i>Bacillus subtilis</i>	Calor	10 ⁸ UFC/g	60 días	Panga (<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>)	Promueve el crecimiento de las microvellosidades intestinales, favorece la inmunidad intestinal y la capacidad antioxidante	Kahyani et al., 2021
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Calor	10 ⁸ UFC/g	90 días	Langostino malayo (<i>Macrobrachium rosenbergii</i>)	Mejora los parámetros inmunitarios y la resistencia a enfermedades	Dash et al., 2015
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PP4012	Calor	10 ⁵ y 10 ⁶ UFC/g	2 semanas	Gamba blanca (<i>Penaeus vannamei</i>)	Disminuye la mortalidad frente a <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , mejora el sistema inmune, el crecimiento y modula beneficiosamente la microbiota intestinal	Ballantyne et al., 2023
<i>Bacillus cereus</i> BR2	Calor	2x 10 ¹⁰ y 10 ⁸ UFC/g	30 días	Pez gato africano (<i>Clarias</i> sp.)	Aumenta la tasa de crecimiento, supervivencia y conversión del alimento. Mejora la actividad enzimática digestiva y la expresión de genes relacionados con el sistema inmune. Aumenta la resistencia al patógeno <i>Edwardsiella tarda</i> ETS1.1	Yuhana et al., 2024
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Calor	2 mg/kg	90 días	Tilapia juvenil (<i>Oreochromis</i> sp.)	Mejora el crecimiento y aumenta la resistencia a infecciones frente al patógeno <i>Streptococcus agalactiae</i>	Ekasari et al., 2023

2.2. Postbióticos

La terminología que hace referencia a los postbióticos incluye términos como metabióticos, fragmentos de células probióticas (PCF), biógenos o metabolitos y sobrenadantes libres de células (CFS) (Barros et al., 2020). Todos se refieren a factores solubles bioactivos (productos o subproductos metabólicos) producidos por microorganismos probióticos vivos o inanimados después de la ruptura celular provocada por tratamientos térmicos, enzimáticos, ultrasonidos o disolventes entre otros (Homayouni-Rad et al., 2024). Salminen et al., (2021a), sugirieron que, tras la inactivación era necesaria una descripción específica del o los microorganismos, la matriz y el método de inactivación, si ha habido rotura celular, y por lo tanto los componentes celulares obtenidos.

Los componentes celulares se refieren a biomasa, lisados celulares o filtrado celular, que incluirían subestructuras como restos de pared celular, lípidos de membrana o ácidos teicoicos, entre otros (Vinderola et al., 2024). Estos componentes pueden ir acompañados o no de metabolitos, sustancias producidas por los microorganismos y que pueden encontrarse dentro de la célula o pueden excretarse y, por lo tanto, ser externas a la misma (Vinderola et al., 2024) (**Figura 2**). Por otro lado, a partir de estos componentes celulares se pueden obtener sustancias o metabolitos específicos, que necesitarían pasos posteriores a la extracción como centrifugación, diálisis, filtración, liofilización o purificación en columna (Barros et al., 2020). Finalmente, se recogen factores solubles bioactivos como: AGCC, enzimas, péptidos, ácidos teicoicos, muropéptidos derivados de peptidoglicanos, endo- y exopolisacáridos, proteínas de la superficie celular, vitaminas, ácidos orgánicos y plasmalógenos, entre otros (Rafique et al., 2023). Dentro de estos factores se encontrarían los productos extracelulares (ECP), empleados en esta tesis doctoral y obtenidos del microorganismo probiótico SpPdp11 vivo. Independientemente del componente celular obtenido, éste debe conferir algún beneficio fisiológico al hospedador (Thorakkattu et al., 2022). Algunos ejemplos de postbióticos empleados en acuicultura y sus efectos sobre el hospedador se resumen en la **Tabla 3**.

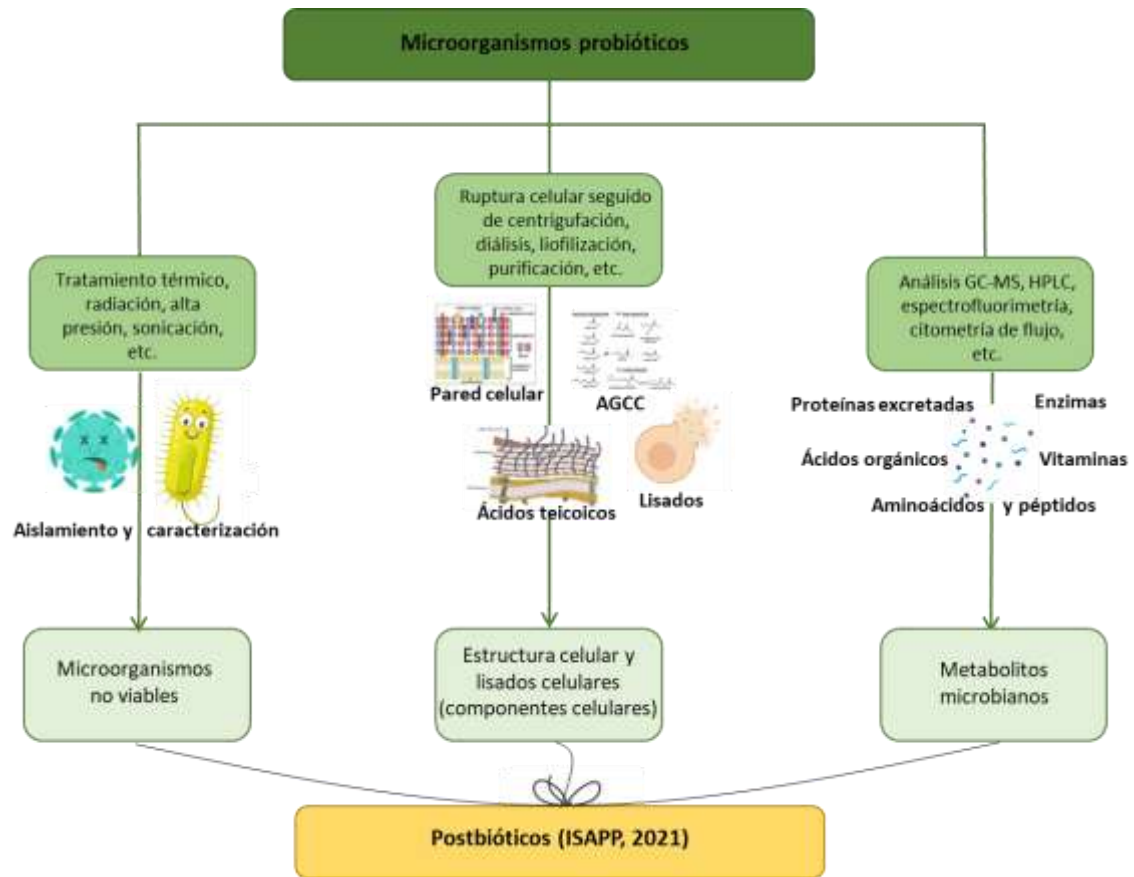


Figura 2. Derivados de los probióticos empleados como potenciales paraprobióticos y postbióticos. Tratamientos como la radiación, presión o temperatura inactivan las células, que se usan como paraprobióticos, en forma no viable. Con la ruptura de las células y los métodos de separación se obtienen postbióticos como son los componentes celulares y los metabolitos microbianos. Fuente: elaboración propia.

Tabla 3. Ejemplos de postbióticos empleados en acuicultura.

Postbiótico	Tipo	Dosis	Modo/tiempo de administración	Especie cultivada	Efecto en el hospedador	Ref.
<i>Lactobacillus</i> y <i>Leuconostoc</i>	Producto de fermentación	3.0 mg/g	Dieta/4 días	Trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Efecto antagonista frente al patógeno <i>Lactococcus garvieae</i> . Modulación de la microbiota intestinal	Pérez-Sánchez et al., 2020
<i>Bacillus pumilus</i> SE5	Peptidoglicano y ácido lipoteicoico	1×10^8 UFC/g	Dieta/60 días	Mero moteado (<i>Epinephelus coioides</i>)	Modulación de la microbiota y la inmunidad intestinal. Expresión de genes relacionados con efectores antibacterianos	Yang et al., 2019
<i>Weissella cibaria</i>	Producto de fermentación	10^7 UFC/g y 10^6 UFC/mL	Dieta e intraperitoneal/30 días	Trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Aumenta la supervivencia y la resistencia frente al patógeno <i>Yersinia ruckeri</i>	Quintanilla-Pineda et al., 2024
<i>Bacillus siamensis</i>	Sobrenadante libre de células	1×10^8 UFC/g	Dieta/56 días	Lubina asiática (<i>Lateolabrax maculatus</i>)	Promueve el crecimiento, refuerza el sistema inmune, el hígado y la barrera intestinal	Liu et al., 2024
<i>Cetobacterium somerae</i> y <i>Lactococcus lactis</i>	Sobrenadante libre de células	0.2 y 0.3 g/kg	Dieta/98 días	Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	Modula la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo. Beneficios en el mucus intestinal, hígado e intestino, modulando positivamente la microbiota intestinal	Yu et al., 2023

<i>Lactobacillus plantarum</i>	Extracto libre de células	3 mL/300 g	Dieta/15 días	Gamba blanca (<i>Penaeus vannamei</i>)	Modula positivamente la microbiota intestinal	Zheng et al., 2020
<i>Burkholderia</i> sp. HD05	Sobrenadante libre de células	50 mL/25 L	Baño/14 días	Carpa herbívora (<i>Ctenopharyngodon idellus</i>)	Actividad antifúngica frente a <i>Saprolegnia</i> sp.	Zhang et al., 2019
<i>Akkermansia muciniphila</i>	Sobrenadante libre de células	1.0×10^8 UFC/g	Dieta/60 días	Carpa (<i>Cyprinus carpio</i> L.)	Regula la glucosa en sangre evitando desordenes y regula la gluconeogénesis en hígado	Yang et al., 2023
<i>Lactobacillus casei</i> K17	Producto de fermentación	30 mL / 300 g	Dieta/69 días	Perca americana (<i>Micropterus salmoides</i>)	Mejora el crecimiento, la absorción de nutrientes en el intestino y la inmunidad inespecífica	Wang et al., 2021
<i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> y <i>Saccharomyces</i>	Fraciones de células lisadas	0.25%, 0.5%, 1%, 2% y 4%	Dieta/6 semanas	Camarón nipón (<i>Macrobrachium nipponense</i>)	Aumenta el crecimiento, supervivencia, inmunidad no específica y salud intestinal (aumento del microvilli y refuerzo de membrana basal de enterocitos)	Wang et al., 2023

2.3. Legislación en la Unión Europea sobre derivados bióticos

A nivel legislativo, según el informe del Panel de Nutrición de la EFSA, (2024) los derivados bióticos se englobarían, al igual que los probióticos, en la categoría de “nuevos alimentos”, siendo aislados de o producidos por microorganismos. Además, sería necesario conocer la identificación taxonómica y el papel particular del microorganismo del que se obtienen y, notificar cuando corresponda si éste ha sufrido modificación genética, o cuál es su estatus QPS si lo tuviera. La caracterización del nuevo alimento incluye proporcionar información cualitativa y cuantitativa del mismo, proceso de producción, información nutricional, riesgos asociados (toxicidad, alergias, etc.), parámetros relacionados con la estabilidad y la calidad o interacción con otros ingredientes alimentarios, entre otras. En este sentido, aunque tanto los probióticos como sus derivados deben cumplir con estrictos requisitos de seguridad y eficacia según la EFSA, podría considerarse que estos derivados bióticos tendrían una vía más rápida o menos compleja para su aprobación en comparación con los probióticos.

La posibilidad de esta aprobación más rápida se asocia a algunas ventajas prácticas de los derivados bióticos sobre los probióticos, como una manipulación, almacenamiento y transporte más sencillos, un mejor control de la seguridad y una interacción mínima o nula con el alimento o sus ingredientes, presentando a su vez mecanismos de acción y efectos beneficiosos muy similares a los de los probióticos (Sharafi et al., 2024).

2.4. Mecanismos de acción de paraprobióticos y postbióticos

Al igual que los probióticos, los paraprobióticos y postbióticos son especialmente relevantes en ámbitos relacionados con la salud, la industria alimentaria y la farmacéutica. En relación a la salud, paraprobióticos y postbióticos han demostrado ejercer efectos beneficiosos para el hospedador como: (i) efectos inmunomoduladores; (ii) efectos antagónicos contra patógenos; (iii) efectos antitumorales y (iv) protección de la barrera intestinal (Teame et al., 2020b; Nataraj et al., 2020).

En el ámbito de la inmunidad, ya sea innata o adaptativa, y la prevención de infecciones, los paraprobióticos y postbióticos suponen una mayor seguridad en general, especialmente en pacientes inmunodeprimidos, en comparación con los probióticos vivos y las preocupaciones relacionadas con la sepsis probiótica, la respuesta inflamatoria, la resistencia a los antibióticos y la transferencia de genes (Katkowska et al., 2021). Así,

algunos peptidoglicanos han demostrado aumentar la capacidad de inhibir la liberación de citoquinas inflamatorias (Teame et al., 2020b), inducir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y favorecer la inmunidad mediada por células T, actividad del complemento y células NK (Miyazawa et al., 2015). El carácter soluble o subcelular de paraprobióticos y postbióticos permite una mejor accesibilidad al patrón molecular asociado a microorganismos (MAMP) durante el reconocimiento y la interacción con los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Ello aumenta las probabilidades de desencadenar respuestas más específicas frente a los diferentes patógenos mediante interacciones ligando-receptor, también específicas, en comparación con las células completas de los probióticos (Nataraj et al., 2020).

Con respecto a los efectos antagónicos frente a patógenos, algunos paraprobióticos y postbióticos han demostrado ejercer efectos antifúngicos (Fahim et al., 2021) y antimicrobianos, inhibir el crecimiento de patógenos o interferir en la formación de biofilm (Amini et al., 2023; García-Márquez et al., 2024), mostrando su potencial como herramienta terapéutica y de control de enfermedades (Isaac-Bamgbove et al., 2024). Recientemente se ha observado también la capacidad de paraprobióticos y postbióticos de actuar como agentes anticancerígenos (Mehta et al., 2023), induciendo efectos antiproliferativos, antimigratorios y relacionados con la apoptosis en ensayos con líneas celulares tumorales (Erfanian et al., 2024).

Por otro lado, ambos derivados bióticos pueden favorecer la integridad de la barrera intestinal, equilibrando su microbiota (Panitsidis et al., 2023). Así, proteínas de la superficie celular, exopolisacáridos o bacteriocinas de ciertos probióticos como *Lactiplantibacillus plantarum* NCU116 o *Lactobacillus gasseri* LA39 entre otros, se unen competitivamente al epitelio intestinal e inhiben la infección por patógenos (Scott et al., 2022). Los acildipeptidos celulares desempeñan un papel importante en la mejora de la permeabilidad intestinal al activar la autofagia en las células epiteliales intestinales, promoviendo la reparación del intestino (Liang y Xing, 2023). Además, hay datos que apuntan que los polisacáridos extracelulares contribuyen a la regulación de la función de la barrera intestinal (Teame et al., 2020a) y algunos paraprobióticos refuerzan las uniones celulares en el epitelio intestinal, mejorando la homeostasis de la mucosa y reduciendo la translocación bacteriana (Liu et al., 2024).

2.5. Aplicaciones de paraprobióticos y postbióticos en acuicultura

Los paraprobióticos y postbióticos pueden ser más seguros que las células vivas del probiótico del que proceden y solventar los problemas derivados del uso de antibióticos, pero además tienen un gran potencial y aplicaciones prometedoras en la acuicultura (Aguilar-Toalá et al., 2018).

En cuanto a los beneficios en organismos cultivados, mejoran significativamente el rendimiento del crecimiento, así como el estado de salud del hospedador de muy diversas maneras (Teame et al., 2020b; Quintanilla-Pineta et al., 2023; Fachri et al., 2024). Por ejemplo, la dieta suplementada con el paraprobiótico *Lactobacillus plantarum* LP20 inactivado por calor mejoró significativamente el rendimiento del crecimiento y la inmunidad de camarones juveniles (*Marsupenaeus japonicus*) (Dawood et al., 2015). El paraprobiótico derivado de *Pseudomonas aeruginosa* VSG2 inactivado por calor como suplemento en la dieta de la carpa (*Cyprinus carpio*), mejoró el nivel de antioxidantes, la resistencia a las enfermedades y la inmunidad no específica de los peces (Giri et al., 2020). La suplementación de la dieta con un extracto libre de células derivado de *L. plantarum* mejoró significativamente el rendimiento del crecimiento y la resistencia al estrés del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) (Zheng et al., 2020). Además, la mezcla de tres cepas de las especies *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* y *Cetobacterium somerae* inactivadas aumentó la resistencia del esturión (*Acipenser sturio*) frente al patógeno *Aeromonas veronii*, incrementando de forma significativa la abundancia de bacterias beneficiosas en el intestino (Teame et al., 2020a). Por su parte, Yang et al. (2019) evaluaron los postbióticos de *Bacillus pumilus* SE5, principalmente su peptidoglicano y el ácido lipoteicoico, observando un efecto beneficioso en la microbiota intestinal del mero (*Epinephelus coioides*).

2.6. Ventajas adicionales de paraprobióticos y postbióticos

La gran diversidad de compuestos que se definen como paraprobióticos y postbióticos ofrecen una serie de ventajas con respecto a los probióticos. En el campo farmacéutico y de la alimentación, paraprobióticos y postbióticos presentan poca o ninguna interacción con compuestos de la matriz o ingredientes del producto a elaborar, lo que aumenta la vida útil del mismo (Cuevas-González et al., 2020). También se mantienen estables en un amplio rango de pH y temperatura, lo que permite su adición junto a ingredientes con

mayor acidez y antes de un posible procesamiento térmico, sin que su funcionalidad se vea comprometida (Siciliano et al., 2021), minimizando las posibilidades de contaminación microbiana después del procesamiento, y mejorando en muchas ocasiones la calidad del producto final (Aguilar-Toalá et al., 2018). Además, dependiendo del producto, estos derivados pueden no requerir el uso de cadena de frío durante el almacenamiento y transporte, lo que aporta una gran ventaja económica para el fabricante, facilitando también el acceso a consumidores (Barros et al., 2020).

Esta serie de ventajas tienen especial importancia en la industria acuícola a la hora de administrar derivados bióticos en la alimentación de organismos cultivados (Tao et al., 2024). Además, conllevan facilidad de producción y almacenamiento, así como una mejor disponibilidad y mecanismos de acción más específicos en el proceso de producción acuícola, lo que favorece al sector. Esta versatilidad permite optimizar métodos de obtención y selección de los diferentes derivados bióticos en función del objetivo y aplicación que se requiera (Vallejo-Cordoba et al., 2020).

3. Modulación del potencial de paraprobióticos y postbióticos

Según el microorganismo de partida, sus características y el tratamiento o las condiciones a las que se le someta, la composición del paraprobiótico o postbiótico puede ser diferente, con variaciones en las características y concentración de su composición final, y por lo tanto en los efectos que puedan ejercer (Salminen et al., 2021). Otros factores que pueden influir en el potencial de estos derivados son los métodos de conservación y aplicación empleados (Nataraj et al., 2020).

La eficacia de los paraprobióticos depende en gran medida del método de inactivación empleado y que dicho método preserve el componente celular de interés que actuará como paraprobiótico (Almada et al., 2016) (**Figura 3**). Los métodos afectarán a la superficie celular y por lo tanto a componentes como el peptidoglicano, ácido teicoico, ácido lipoteicoico o la célula como una unidad completa (Almada et al., 2016). Los distintos métodos de inactivación afectarán a la eficacia de cada componente de forma diferente de una cepa a otra. Por ejemplo, Almada et al., (2021) determinaron seis métodos de inactivación diferentes (calor, pH bajo, pH alto, irradiación gamma y dióxido de carbono (CO₂) supercrítico) para obtener paraprobióticos de *Lactobacillus acidophilus* 5 (LA), *Lactocaseibacillus casei* 1 (LC) y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* 12 (BB) y ver

cuál funcionaba mejor en cada cepa en función de su metabolismo enzimático y la morfología celular. Los resultados mostraron que el mejor método para *L. casei* fue el ultrasonido mientras que para *L. acidophilus* y *B. animalis* subsp. *lactis* fue el tratamiento térmico. En cualquier caso, el objetivo es la estandarización u optimización en la obtención del derivado biótico, y que éste cumpla el efecto deseado en el hospedador adecuado (Cuevas-González et al., 2019).

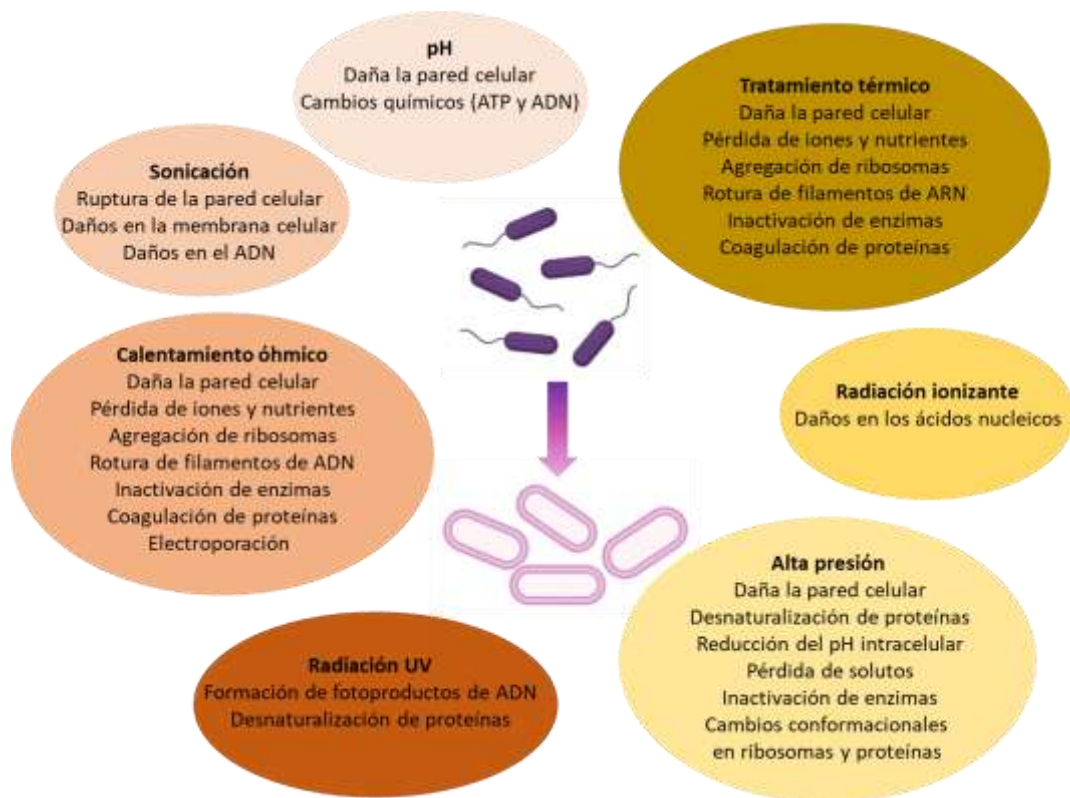


Figura 3. Principales formas de inactivación de microorganismos. Fuente: de Almada et al. (2016).
Elaboración propia.

Cabe esperar que los postbióticos se vean influenciados de la misma forma por los métodos de inactivación mencionados anteriormente. Además, en un entorno de producción, los componentes del medio de crecimiento del microorganismo también pueden influir en una preparación de postbióticos, especialmente cuando lo que se pretende potenciar son determinados componentes o metabolitos (Vinderola et al., 2024). Para la modulación del potencial postbiótico se deberán realizar modificaciones en el cultivo del microorganismo de procedencia a través de cambios en parámetros físico-químicos como pH, temperatura, salinidad, tiempos de incubación o tiempos de

fermentación, así como modificaciones en la composición de los medios de cultivo del microorganismo (Moradi et al., 2021). Esto provocaría cambios en el metabolismo bacteriano y con ello, en la composición del postbiótico y su modo de acción (Ma y Hu, 2023).

3.1. Modificación de parámetros físico-químicos para la obtención de postbióticos

Diferentes estudios buscan optimizar los parámetros para aumentar y mejorar la producción de postbióticos, además de identificar las condiciones óptimas de conservación y estabilidad de los mismos con objeto de facilitar el desarrollo experimental (Pimentel et al., 2023). Así, existen diferentes técnicas de análisis instrumental y factores que afectan la composición química de los postbióticos.

Se ha mencionado que, modificaciones en el tiempo, temperatura de incubación, pH o tiempo de fermentación de una cepa probiótica influyen en el rendimiento, composición y estructura de los postbióticos obtenidos (Moradi et al., 2020). Por ejemplo, determinados valores de temperatura y tiempo de incubación resultan en incrementos en la capacidad antifúngica (Garnier et al., 2019) o antibacteriana (Chang et al., 2021) de diferentes cepas probióticas. De igual forma, variaciones de pH afectan a la producción de bacteriocinas por parte de algunos microorganismos (Moradi et al., 2021). También se han observado modificaciones a nivel estructural (Bengoa et al., 2021), en la cantidad de un compuesto concreto presente en el postbiótico o bien en la coproducción de diferentes metabolitos de interés al modificar los tiempos de fermentación y temperatura en el cultivo del microorganismo (Amiri et al., 2021; Rozhkova et al., 2023). En determinados alimentos, modificaciones en los valores de pH y tiempos de fermentación han aumentado los plazos de conservación, así como las propiedades organolépticas de ciertos alimentos (Asqardokht-Aliabadi et al., 2024).

3.2. Modificación de la composición del medio de cultivo para la obtención de postbióticos

Uno de los factores que más influyen en la modulación de la composición de los postbióticos es la variación en los nutrientes proporcionados en el medio de crecimiento empleado para el cultivo del microorganismo en cuestión (Moradi et al., 2020). Normalmente, se sustituyen compuestos o suplementan otros nuevos en el medio sintético

o comercial en el que crezca el microorganismo probiótico, o bien se modifica la concentración de algún compuesto de interés ya presente en dicho medio. Por ejemplo, un aumento en la concentración de glucosa y extracto de levadura en un medio comercial como de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) aumentó y mejoró los metabolitos producidos por BAL con actividad antibacteriana frente a distintos patógenos (Ooi et al., 2015). Por otro lado, un suplemento de inulina en un medio comercial mejoró la composición de compuestos volátiles, así como la actividad antibacteriana y antioxidante de los postbióticos producidos por los microorganismos de estudio (Verotta et al., 2021).

El interés que han generado los postbióticos en las diferentes industrias (alimentaria, farmacéutica, biotecnológica, etc.), ha dado lugar a que la producción de derivados bióticos crezca y se modifique con el objetivo de obtener el mayor potencial biológico y rendimiento tecnológico posible. Sin embargo, su producción implica el uso de medios de cultivo sintéticos, en muchas ocasiones con un alto coste económico y escasa sostenibilidad (Moradi et al., 2020).

3.2.1. Sustratos sostenibles. Microalgas

La producción de postbióticos y la búsqueda de sustratos que facilitan la modulación de las posibles capacidades postbióticas implica el uso de productos que sean abundantes, asequibles y renovables, como pueden ser los subproductos derivados de la actividad agrícola o industrial y que incluyen biomasa de lignocelulosa (Amiri et al., 2021), suero de queso (Nasri et al., 2019), paja de caña de azúcar (Oliveira et al., 2023) o fibras solubles de mucílago de chía (Vera-Santander et al., 2024).

En este sentido, las microalgas se presentan como una alternativa muy prometedora a las fuentes de carbono convencionales en los medios de crecimiento bacteriano. Estos organismos pueden proporcionar nutrientes como oligosacáridos, polisacáridos y compuestos fenólicos para el metabolismo bacteriano y puede mejorar o maximizar la producción de postbióticos (Ricos-Muñoz et al., 2023), afectando al proceso de fermentación, la composición bioquímica o la funcionalidad de los metabolitos secretados (Pagnini et al., 2023; Ricos-Muñoz et al., 2023). Además, las microalgas han demostrado aportar compuestos con carácter nutracéutico con efectos beneficiosos para los peces (Galafat et al., 2025), por lo que sería posible plantear no sólo su aportación a la composición derivada del probiótico cultivado, sino un enriquecimiento con los productos derivados de la propia microalga. Este proceso de obtención de postbióticos

precisaría de una optimización y estandarización, pues el uso de microalgas para dicha finalidad se presenta como una novedad. Se precisan más investigaciones aplicadas que demuestren el potencial, el efecto o las peculiaridades de los derivados bióticos obtenidos, todo ello dirigido a un marco sostenible en la industria de la acuicultura.

REFERENCIAS

Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., & Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009>

Ahire, J. J., Jakkamsetty, C., Kashikar, M. S., Lakshmi, S. G., & Madempudi, R. S. (2021). *In vitro* evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* UBLP40 isolated from traditional indigenous fermented food. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(5), 1413-1424. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09775-7>

Akbari, H., Shekrabi, S. P. H., Soltani, M., & Mehrgan, M. S. (2021). Effects of potential probiotic *Enterococcus casseliflavus* (EC-001) on growth performance, immunity, and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in common carp (*Cyprinus carpio*). *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09771-x>

Almada, C. N., Almada-Érix, C. N., Bonatto, M. S., Pradella, F., dos Santos, P., Abud, Y. K., Farias, A. S., Martínez, J., Sant'Anna Filho, C. B., Lollo, P. C., Costa, W. K. A., Magnani, M., & Sant'Ana, A. S. (2021). Obtaining paraprobiotics from *Lactobacillus acidophilus*, *Lactocaseibacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* using six inactivation methods: Impacts on the cultivability, integrity, physiology, and morphology. *Journal of Functional Foods*, 87, 104826. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104826>

Amiri, S., Rezazadeh-Bari, M., Alizadeh-Khaledabad, M., Rezaei-Mokarram, R., & Sowti-Khiabani, M. (2021). Fermentation optimization for co-production of postbiotics by *Bifidobacterium lactis* BB12 in cheese whey. *Waste and Biomass Valorization*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01429-7>

Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M.E., Stanton, C., Pineiro, M., & Ben Embarek, P. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada, Rome.

Arora, M., & Baldi, A. (2015). Regulatory categories of probiotics across the globe: a review representing existing and recommended categorization. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33, S2-S10. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.150868>

Asqardokht-Aliabadi, A., Sarabi-Aghdam, V., Homayouni-Rad, A., & Hosseinzadeh, N. (2024). Postbiotics in the Bakery Products: Applications and Nutritional Values. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-23. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10327-y>

Ballantyne, R., Lee, J. W., Wang, S. T., Lin, J. S., Tseng, D. Y., Liao, Y. C., Chang, H. T., Lee, T. Y., & Liu, C. H. (2023). Dietary administration of a postbiotic, heat-killed *Pediococcus pentosaceus* PP4012 enhances growth performance, immune response and

modulates intestinal microbiota of white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 139, 108882. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108882>

Barros, C. P., Guimarães, J. T., Esmerino, E. A., Duarte, M. C. K., Silva, M. C., Silva, R., Ferreira, B. M., Sant'Ana, A. S., Freitas, M. Q., & Cruz, A. G. (2020). Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. *Current Opinion in Food Science*, 32, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.12.003>

Barui, K., Choudhury, T. G., Kamilya, D., Devi, A. A., Monsang, S. J., Rathore, G., Devi, W. M., & Kumar, M. (2023). Paraprobiotic supplementation to fish feed: effects on the immune support system and control of *Aeromonas hydrophila* infection in *Labeo rohita*. *Aquaculture International*, 1-24. <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01372-5>

Bengoa, A. A., Dardis, C., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2021). Health-promoting properties of *Lactocaseibacillus paracasei*: A focus on kefir isolates and exopolysaccharide-producing strains. *Foods*, 10(10), 2239. <https://doi.org/10.3390/foods10102239>

Bhawal, S., Kumari, A., Rana, S., Kapila, S., & Kapila, R. (2023). Scope of bacterial surface effector molecules beyond probiotics. *Food Bioscience*, 1031. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103180>

Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., Temblay, A., & Ouwehand, A. C. (2020). Criteria to qualify microorganisms as “probiotic” in foods and dietary supplements. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1662. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662>

Bourdichon, F., Budde-Niekiel, A., Dubois, A., Fritz, D., Hatte, J. L., Laulund, S., McAuliffe, O., Ouwehand, A. C., Yao, S., Zgoda, A., Zuliani, V., & Morelli, L. (2022). Inventory of microbial food cultures with safety demonstration in fermented food products Update of the Bulletin of the IDF N° 377-2002, N° 455-2012 and N° 495-2018. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 514.

Boyte, M. E., Akhtar, N., Koshy, B., & Roe, A. L. (2025). A review of probiotic ingredient safety supporting monograph development conducted by the United States Pharmacopeia (USP). *Journal of Dietary Supplements*, 22(1), 123-161. <https://doi.org/10.1080/19390211.2024.2314488>

Cámara-Ruiz, M., Balebona, M. C., Moriñigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2020). Probiotic *Shewanella putrefaciens* (SpPdp11) as a fish health modulator: a review. *Microorganisms*, 8(12), 1990. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121990>

Cerezo, I.M., Domínguez-Maqueda, M., Carmen Balebona, M., Martínez-Manzanares, E., Arijó, S. (2022). Application methods of probiotics and options. In: Austin, B., Sharifuzzaman, S. (eds), *Probiotics in Aquaculture*. Springer, 25–52. https://doi.org/10.1007/978-3-030-98621-6_3

Cerezo, I. M., Pérez-Gómez, O., Bautista, R., Seoane, P., Esteban, M. Á., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., & Tapia-Paniagua, S. T. (2023). SpPdp11 administration in diet modified the transcriptomic response and its microbiota associated in mechanically induced wound *Sparus aurata* skin. *Animals*, 13(2), 193. <https://doi.org/10.3390/ani13020193>

Chabrillón, M., Arijo, S., Díaz-Rosales, P., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A. (2006). Interference of *Listonella anguillarum* with potential probiotic microorganisms isolated from farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.). *Aquaculture Research*, 37, 78–86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01400.x>

Chabrillón, M., Rico, R.M., Arijo, S., Díaz-Rosales, P., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A. (2005a). Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Disease*, 28:531–537. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00657.x>

Chabrillón, M., Rico, R.M., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A. (2005b). Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, 28, 229–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00623.x>

Chang, H. M., Foo, H. L., Loh, T. C., Lim, E. T. C., & Abdul Mutalib, N. E. (2021). Comparative studies of inhibitory and antioxidant activities, and organic acids compositions of postbiotics produced by probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from Malaysian foods. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 602280. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.602280>

Chang, Y. H., Jeong, C. H., Cheng, W. N., Choi, Y., Shin, D. M., Lee, S., & Han, S. G. (2021). Quality characteristics of yogurts fermented with short-chain fatty acid-producing probiotics and their effects on mucin production and probiotic adhesion onto human colon epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, 104(7), 7415-7425. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19820>

Choudhury, T. G., & Kamilya, D. (2019). Paraprobiotics: An aquaculture perspective. *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 1258-1270. <https://doi.org/10.1111/raq.12290>

Contente, D., Díaz-Formoso, L., Feito, J., Hernández, P. E., Muñoz-Atienza, E., Borrero, J., Poeta, P., & Cintas, L. M. (2024). Genomic and functional Evaluation of Two *Lactocaseibacillus paracasei* and Two *Lactiplantibacillus plantarum* strains, isolated from a rearing tank of rotifers (*Brachionus plicatilis*), as probiotics for aquaculture. *Genes*, 15(1), 64. <https://doi.org/10.3390/genes15010064>

Cordero, H., Guardiola, F. A., Tapia-Paniagua, S. T., Cuesta, A., Meseguer, J., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., & Esteban, M. Á. (2015). Modulation of immunity and gut microbiota after dietary administration of alginate encapsulated *Shewanella putrefaciens* Pdp11 to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 608-618. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.010>

Cordero, H., Morcillo, P., Meseguer, J., Cuesta, A., & Esteban, M. Á. (2016). Effects of *Shewanella putrefaciens* on innate immunity and cytokine expression profile upon high stocking density of gilthead seabream specimens. *Fish & Shellfish Immunology*, 51, 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.02.008>

Cristofori, F., Dargenio, V. N., Dargenio, C., Miniello, V. L., Barone, M., & Francavilla, R. (2021). Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of probiotics in gut inflammation: a door to the body. *Frontiers in Immunology*, 12, 578386. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.578386>

Cuevas-González, P. F., Liceaga, A. M., & Aguilar-Toalá, J. E. (2020). Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Research International*, 136, 109502. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109502>

Daliri, E. B. M., Ofosu, F. K., Xiuqin, C., Chelliah, R., & Oh, D. H. (2021). Probiotic effector compounds: Current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 12, 655705. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.655705>

Dash, G., Raman, R. P., Prasad, K. P., Makesh, M., Pradeep, M. A., & Sen, S. (2015). Evaluation of paraprobiotic applicability of *Lactobacillus plantarum* in improving the immune response and disease protection in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Fish & Shellfish Immunology*, 43(1), 167-174. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.007>

Dawood, M. A., Koshio, S., Ishikawa, M., & Yokoyama, S. (2015). Effects of heat killed *Lactobacillus plantarum* (LP20) supplemental diets on growth performance, stress resistance and immune response of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 442, 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.005>

De La Banda, I. G., Lobo, C., León-Rubio, J. M., Tapia-Paniagua, S., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., Moreno-Ventas, X., Lucas, L. M., Linares, F., Arce, F., & Arijo, S. (2010). Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*, 306(1-4), 281-288. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.008>

De la Banda, I., Lobo, C., Chabrillón, M., León-Rubio, J. M., Arijo, S., Pazos, G., Lucas, M. L., & Moriñigo, M. Á. (2012). Influence of dietary administration of a probiotic strain *Shewanella putrefaciens* on Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) growth, body composition and resistance to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture Research*, 43(5), 662-669. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02871.x>

Díaz-Rosales, P., Arijo, S., Chabrillón, M., Alarcón, F.J., Tapia-Paniagua, S.T., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A. (2009). Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*, 293, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.050>

Donelli, G., Vuotto, C., & Mastromarino, P. (2013). Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 24(1). <https://doi.org/10.3402/mehd.v24i0.20105>

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P. S., Fernández-Escámez, P. S., ... Herman, L. (2021a). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 14: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2021. *EFSA Journal*, 19(7), e06689. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6689>

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P. S., Fernández-Escámez, P. S., . Herman, L. (2024). Update of the list of qualified presumption of safety (QPS) recommended microbiological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 20: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2024. *EFSA Journal*, 22(7), e8882. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8882>

Eissa, E. S. H., Baghdady, E. S., Gaafar, A. Y., El-Badawi, A. A., Bazina, W. K., Abd Al-Kareem, O. M., & Abd El-Hamed, N. N. (2022). Assessing the influence of dietary *Pediococcus acidilactici* probiotic supplementation in the feed of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) on farm water quality, growth, feed utilization, survival rate, body composition, blood biochemical parameters, and intestinal histology. *Aquaculture Nutrition*, 2022(1), 5841220. <https://doi.org/10.1155/2022/5841220>

Ekasari, J., Mirza, V. N., Fauzi, I. A., Hashimoto, K., & Suprayudi, M. A. (2023). Evaluation of growth and health performance of juvenile tilapia *Oreochromis* sp. fed with various supplementation of heat-killed *Lactobacillus plantarum*. *Aquaculture Nutrition*, 2023(1), 8860364. <https://doi.org/10.1155/2023/8860364>

El-Bab, A. F. F., Saghir, S. A., El-Naser, I. A. A., El-Kheir, S. M. A., Abdel-Kader, M. F., Alruhaimi, R. S., Alqhtani, H. A., Mahmoud, A. M., Naiel, M. A. E., & El-Raghi, A. A. (2022). The effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, oxidative status, and immune response of sea bream (*Sparus aurata*). *Life*, 12(7), 1013. <https://doi.org/10.3390/life12071013>

Erfanian, N., Safarpour, H., Tavakoli, T., Mahdiabadi, M. A., Nasser, S., & Namaei, M. H. (2024). Investigating the therapeutic potential of *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus rhamnosus* postbiotics through apoptosis induction in colorectal HT-29 cancer cells. *Iranian Journal of Microbiology*, 16(1), 68. <https://doi.org/10.18502/ijm.v16i1.14873>

Espinosa, C., & Esteban, M. Á. (2020). Effect of dietary supplementation with yeast *Saccharomyces cerevisiae* on skin, serum and liver of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Journal of Fish Biology*, 97(3), 869-881. <https://doi.org/10.1111/jfb.14449>

Fachri, M., Amoah, K., Huang, Y., Cai, J., Alfatat, A., Ndandala, C. B., Shija, V. M., Jin, X., Bissih, F., & Chen, H. (2024). Probiotics and paraprobiotics in aquaculture: a sustainable strategy for enhancing fish growth, health and disease prevention-a review. *Frontiers in Marine Science*, 11, 1499228. <https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1499228>

Fahim, K. M., Badr, A. N., Shehata, M. G., Hassanen, E. I., & Ahmed, L. I. (2021). Innovative application of postbiotics, parabiotics and encapsulated *Lactobacillus plantarum* RM1 and *Lactobacillus paracasei* KC39 for detoxification of aflatoxin M1 in milk powder. *Journal of Dairy Research*, 88(4), 429-435. <https://doi.org/10.1017/S002202992100090X>

Fantinato, V., Camargo, H. R., & Sousa, A. L. O. P. D. (2019). Probiotics study with *Streptococcus salivarius* and its ability to produce bacteriocins and adherence to KB cells. *Revista de Odontologia da UNESP*, 48, e20190029. <https://doi.org/10.1590/1807-2577.02919>

FAO/WHO. (2002). Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO. Food and Nutrition Paper, vol. 85, pp. 1–56.

Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R., & Ouwehand, A. C. (2019). The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. *Microorganisms*, 7(3), 83. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030083>

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365–378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>

Galafat Díaz, A., Sáez, M. I., Vizcaíno, A. J., Barany, A., Perera, E., Sánchez-Ruiz, D., Fuentes, J., Martos-Sitcha, J. A., & Alarcón, F. J. (2025). Assessment of low dietary inclusion of microalgae-derived nutraceuticals to enhance intestinal function in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. Available at SSRN. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.5114644>

Gao, X., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W., & Zhai, Q. (2022). Modulation of gut health using probiotics: the role of probiotic effector molecules. *Journal of Future Foods*, 2(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.03.011>

Garg, V., Velumani, D., Lin, Y. C., & Haye, A. (2024). A comprehensive review of probiotic claim regulations: updates from the Asia-Pacific regions, the United States, and Europe. *PharmaNutrition*, 100423. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2024.100423>

Garnier, L., Mounier, J., Lê, S., Pawtowski, A., Pinon, N., Camier, B., Chatel, M., Garric, G., Thierry, A., Coton, E., & Valence, F. (2019). Development of antifungal ingredients for dairy products: From in vitro screening to pilot scale application. *Food Microbiology*, 81, 97-107. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.003>

Giri, S. S., Jun, J. W., Yun, S., Kim, H. J., Kim, S. G., Kim, S. W., Woo, K. J., Han, S. J., Oh, W. T., Kwon, J., Sukumaran, V., & Park, S. C. (2020). Effects of dietary heat-killed *Pseudomonas aeruginosa* strain VSG2 on immune functions, antioxidant efficacy, and

disease resistance in *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 514, 734489. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734489>

Guardiola, F. A., Porcino, C., Cerezuela, R., Cuesta, A., Faggio, C., & Esteban, M. A. (2016). Impact of date palm fruits extracts and probiotic enriched diet on antioxidant status, innate immune response and immune-related gene expression of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology*, 52, 298-308. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.152>

Guzmán-Villanueva, L. T., Tovar-Ramírez, D., Gisbert, E., Cordero, H., Guardiola, F. A., Cuesta, A., Meseguer, J., Ascencio-Valle, F., & Esteban, M. A. (2014). Dietary administration of β -1, 3/1, 6-glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression. *Fish & Shellfish Immunology*, 39(1), 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.024>

Hendam, B. M., Munir, M. B., Eissa, M. E., El-Haroun, E., van Doan, H., Chung, T. H., & Eissa, E. S. H. (2023). Effects of water additive probiotic, *Pediococcus acidilactici* on growth performance, feed utilization, hematology, gene expression and disease resistance against *Aspergillus flavus* of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Feed Science and Technology*, 303, 115696. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115696>

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews in Gastroenterology & Hepatology* 11, 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

Homayouni-Rad, A., Pouragha, B., Houshyar, J., Soleimani, R. A., Kazemi, S., Keisan, S., & Akhlaghi, A. (2024). Postbiotic application: A review on extraction, purification, and characterization methods. *Food and Bioprocess Technology*, 1-22. <https://doi.org/10.1007/s11947-024-03701-9>

Isaac-Bamgboye, F. J., Mgbechidinma, C. L., Onyeaka, H., Isaac-Bamgboye, I. T., & Chukwugozie, D. C. (2024). Exploring the potential of postbiotics for food safety and human health improvement. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2024(1), 1868161. <https://doi.org/10.1155/2024/1868161>

Ji, J., Jin, W., Liu, S. J., Jiao, Z., & Li, X. (2023). Probiotics, prebiotics, and postbiotics in health and disease. *MedComm*, 4(6), e420. <https://doi.org/10.1002/mco2.420>

Jurado, J., Villasanta-González, A., Tapia-Paniagua, S.T., Balebona, M.C., García de la Banda, I., Morínigo, M.Á., Prieto-Álamo, M.J. (2018). Dietary administration of the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 promotes transcriptional changes of genes involved in growth and immunity in *Solea senegalensis* larvae. *Fish & Shellfish Immunology*, 77, 350-363. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.018>

- Kahyani, F., Pirali-Kheirabadi, E., Shafiei, S., & Shenavar Masouleh, A. (2021). Effect of dietary supplementation of potential probiotic *Weissella confusa* on innate immunity, immune-related genes expression, intestinal microbiota and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 27(5), 1411-1420. <https://doi.org/10.1111/anu.13279>
- Karani, N. G., Uzzal, K. K., & Omoikhoje, I. D. (2023). Probiotics as promising therapeutics: a review of literature. *International Research Journal of Modernization in Engineering Technology and Science*, 5(2), e-ISSN: 2582-5208.
- Katkowska, M., Garbacz, K., & Kusiak, A. (2021). Probiotics: should all patients take them? *Microorganisms*, 9(12), 2620. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122620>
- Kothari, D., Patel, S., & Kim, S. K. (2019). Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 537-547. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.104>
- Lawson, P. A., & Patel, N. B. (2021). The strength of chemotaxonomy. *Trends in the systematics of bacteria and fungi*. CABI Publishing, Wallingford, 141-167. <https://doi.org/10.1079/9781789244984.0000>
- Lee, N. K., Park, Y. S., Kang, D. K., & Paik, H. D. (2023). Paraprobiotics: definition, manufacturing methods, and functionality. *Food Science and Biotechnology*, 32(14), 1981-1991. <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01378-y>
- Lemaire, O. N., Méjean, V., & Iobbi-Nivol, C. (2020). The *Shewanella* genus: ubiquitous organisms sustaining and preserving aquatic ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(2), 155-170. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz031>
- Liang, B., & Xing, D. (2023). The current and future perspectives of postbiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 15(6), 1626-1643. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10045-x>
- Liu, C., Qi, X., Li, D., Zhao, L., Li, Q., Mao, K., Shen, G., & Wang, R. (2024). *Limosilactobacillus fermentum* HF06-derived paraprobiotic and postbiotic alleviate intestinal barrier damage and gut microbiota disruption in mice with ulcerative colitis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104(3), 1702-1712. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13057>
- Liu, Z. Y., Yang, H. L., Li, S., Cai, G. H., Ye, J. D., Zhang, C. X., & Sun, Y. Z. (2024). Paraprobiotic and postbiotic forms of *Bacillus siamensis* improved growth, immunity, liver and intestinal health in *Lateolabrax maculatus* fed soybean meal diet. *Fish & Shellfish Immunology*, 145, 109370. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109370>
- Lobo, C.; Tapia-Paniagua, S.T.; Moreno-Ventas, X.; Alarcón, F.J.; Rodríguez, C.; Balebona, M.C.; Moriñigo, M.A.; García de la Banda, I. (2014). Benefits of probiotic administration on growth and performance along metamorphosis and weaning of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 433, 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.011>

Luo, K., Tian, X., Wang, B., Wei, C., Wang, L., Zhang, S., Liu, Y., Li, T., & Dong, S. (2021). Evaluation of paraprobiotic applicability of *Clostridium butyricum* CBG01 in improving the growth performance, immune responses and disease resistance in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 544, 737041. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737041>

Ma, M., & Hu, Q. (2024). Microalgae as feed sources and feed additives for sustainable aquaculture: prospects and challenges. *Reviews in Aquaculture*, 16(2), 818-835. <https://doi.org/10.1111/raq.12869>

Martos-Sitcha, J. A., Mancera, J. M., Prunet, P., & Magnoni, L. J. (2020). Welfare and stressors in fish: Challenges facing aquaculture. *Frontiers in Pphysiology*, 11, 162. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00162>

Mazziotta, C., Tognon, M., Martini, F., Torreggiani, E., & Rotondo, J. C. (2023). Probiotics mechanism of action on immune cells and beneficial effects on human health. *Cells*, 12(1), 184. <https://doi.org/10.3390/cells12010184>

Mehta, J. P., Ayakar, S., & Singhal, R. S. (2023). The potential of paraprobiotics and postbiotics to modulate the immune system: A Review. *Microbiological Research*, 127449. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127449>

Merenstein, D., Pot, B., Leyer, G., Ouwehand, A. C., Preidis, G. A., Elkins, C. A., Hill, C., Lewis, Z. T., Shane, A. L., Zmora, N., Petrova, M. I., Collado, M. C., Morelli, L., Montoya, G. A., Szajewska, H., Tancredi, D. J., & Sanders, M. E. (2023). Emerging issues in probiotic safety: 2023 perspectives. *Gut Microbes*, 15(1), 2185034. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2185034>

Miyazawa, K., Kawase, M., Kubota, A., Yoda, K., Harata, G., Hosoda, M., & He, F. (2015). Heat-killed *Lactobacillus gasseri* can enhance immunity in the elderly in a double-blind, placebo-controlled clinical study. *Beneficial Microbes*, 6(4), 441-450. <https://doi.org/10.3920/BM2014.0108>

Mondal, H., & Thomas, J. (2022). A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture. *Aquaculture International*, 30(4), 1971-2000. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00884-w>

Moradi, M., Kousheh, S. A., Almasi, H., Alizadeh, A., Guimarães, J. T., Yilmaz, N., & Lotfi, A. (2020). Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3390-3415. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12613>

Moradi, M., Molaei, R., & Guimarães, J.T. (2021). A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 143:109722. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109722>

Moroni, F., Naya-Català, F., Piazzon, M. C., Rimoldi, S., Caldach-Giner, J., Giardini, A., Martínez, I., Brambilla, F., Pérez-Sánchez, J., & Terova, G. (2021). The effects of nisin-

producing *Lactococcus lactis* strain used as probiotic on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, gut microbiota, and transcriptional response. *Frontiers in Marine Science*, 8, 659519. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.659519>

Mudaliar, S. B., Poojary, S. S., Bharath Prasad, A. S., & Mazumder, N. (2024). Probiotics and Paraprobiotics: Effects on Microbiota-Gut-Brain axis and their consequent potential in neuropsychiatric therapy. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 16, 1440–1464. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10214-6>

Nasri, F., Alizadeh, A., İncili, G. K., Hayaloğlu, A. A., & Moradi, M. (2024). Investigating chemical composition and functionality of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 postbiotics prepared in classic and cheese whey media. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10435-9>

Nataraj, B. H., Ali, S. A., Behare, P. V., & Yadav, H. (2020). Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial Cell Factories*, 19, 168. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w>

Oliveira, A. L., Seara, M., Carvalho, M. J., de Carvalho, N. M., Costa, E. M., Silva, S., Duarte, M., Pintado, M., Oliveira, C., & Madureira, A. R. (2023). Production of sustainable postbiotics from sugarcane straw for potential food applications. *Applied Sciences*, 13(6), 3391. <https://doi.org/10.3390/app13063391>

Ooi, M. F., Foo, H. L., Loh, T. C., Mohamad, R., Rahim, R. A., & Ariff, A. (2021). A refined medium to enhance the antimicrobial activity of postbiotic produced by *Lactiplantibacillus plantarum* RS5. *Scientific Reports*, 11(1), 7617. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87081-6>

Pagnini, C., Sampietro, G., Santini, G., Biondi, N. & Rodolfi, L. (2023). *Tisochrysis lutea* as a substrate for lactic acid fermentation: biochemical composition, digestibility, and functional properties. *Food*, 12(6), 1128. <https://doi.org/10.3390/foods12061128>

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>

Pimentel, T. C., Cruz, A. G., Pereira, E., da Costa, W. K. A., da Silva Rocha, R., de Souza Pedrosa, G. T., Rocha, C. S., Alves, J. M., Alvarenga, V. O., Sant’Ana, A. S., & Magnani, M. (2023). Postbiotics: An overview of concepts, inactivation technologies, health effects, and driver trends. *Trends in Food Science & Technology*, 138, 199-214. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.06.009>

Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition*, 10, S49-S66. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>

Quintanilla-Pineda, M., Díaz, J., Gutiérrez-Falcon, A., Ibañez, F. C., & Marzo, F. (2023). Profiling a new postbiotic product for its application in fish aquaculture. *Fishes*, 8(6), 304. <https://doi.org/10.3390/fishes8060304>

Quintanilla-Pineda, M., Ibañez, F. C., Garrote-Achou, C., & Marzo, F. (2024). A Novel Postbiotic product based on *Weissella cibaria* for enhancing disease resistance in Rainbow trout: Aquaculture Application. *Animals*, 14(5), 744. <https://doi.org/10.3390/ani14050744>

Rafique, N., Jan, S. Y., Dar, A. H., Dash, K. K., Sarkar, A., Shams, R., Pandey, V. K., Khan, S. A., Amin, Q. A., & Hussain, S. Z. (2023). Promising bioactivities of postbiotics: A comprehensive review. *Journal of agriculture and Food Research*, 100708. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100708>

Ricós-Munoz, N., Soler, A. R., Castagnini, J. M., Moral, R., Barba, F. J., & Pina-Pérez, M. C. (2023). Improvement of the probiotic growth-stimulating capacity of microalgae extracts by pulsed electric fields treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 83, 103256. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103256>

Rocha, S. D. C., Lei, P., Morales-Lange, B., Mydland, L. T., & Øverland, M. (2023). From a cell model to a fish trial: Immunomodulatory effects of heat-killed *Lactiplantibacillus plantarum* as a functional ingredient in aquafeeds for salmonids. *Frontiers in Immunology*, 14, 1125702. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1125702>

Rose, E. C., Odle, J., Blikslager, A. T., & Ziegler, A. L. (2021). Probiotics, prebiotics and epithelial tight junctions: a promising approach to modulate intestinal barrier function. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6729. <https://doi.org/10.3390/ijms22136729>

Rozhkova, I. V., Yurova, E. A., & Leonova, V. A. (2023). Evaluation of the amino acid composition and content of organic acids of complex postbiotic substances obtained on the basis of metabolites of probiotic bacteria *Lactocaseibacillus paracasei* ABK and *Lactobacillus helveticus* H9. *Fermentation*, 9(5), 460. <https://doi.org/10.3390/fermentation9050460>

Sáenz de Rodrigáñez, M. A., Díaz-Rosales, P., Chabrillón, M., Smidt, H., Arijo, S., León-Rubio, J. M., Alarcón, F. J., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., Cara, J. B., & Moyano, F. J. (2009). Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture Nutrition*, 15(2), 177-185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00581.x>

Salminen, S., & von Wright, A. (1998). Current probiotics-safety assured? *Microbial Ecology in Health and Disease*, 10(2), 68-77. <https://doi.org/10.1080/089106098435287>

Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M., Sanders, E., Shamir, R., Swann, J. R., Szajewska, H., & Vinderola, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the

definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(9), 649-667. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>

Schrezenmeir, J., & de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 361s-364s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.361s>

Scott, E., De Paepe, K., & Van de Wiele, T. (2022). Postbiotics and their health modulatory biomolecules. *Biomolecules*, 12(11), 1640. <https://doi.org/10.3390/biom12111640>

Seoane, P., Tapia-Paniagua, S. T., Bautista, R., Alcaide, E., Esteve, C., Martínez-Manzanares, E., ... & Moriñigo, M. A. (2019). TarSynFlow, a workflow for bacterial genome comparisons that revealed genes putatively involved in the probiotic character of *Shewanella putrefaciens* strain Pdp11. *PeerJ*, 7, e6526. <https://doi.org/10.7717/peerj.6526>

Sharafi, H., Divsalar, E., Rezaei, Z., Liu, S. Q., & Moradi, M. (2024). The potential of postbiotics as a novel approach in food packaging and biopreservation: a systematic review of the latest developments. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(33), 12524-12554. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2253909>

Sharma, N., Kang, D. K., Paik, H. D., & Park, Y. S. (2023). Beyond probiotics: A narrative review on an era of revolution. *Food Science and Biotechnology*, 32(4), 413-421. <https://doi.org/10.1007/s10068-022-01212-x>

Shija, V. M., Amoah, K., & Cai, J. (2023). Effect of bacillus probiotics on the immunological responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A review. *Fishes*, 8(7), 366. <https://doi.org/10.3390/fishes8070366>

Siciliano, R. A., Reale, A., Mazzeo, M. F., Morandi, S., Silvetti, T., & Brasca, M. (2021). Paraprobiotics: A new perspective for functional foods and nutraceuticals. *Nutrients*, 13(4), 1225. <https://doi.org/10.3390/nu13041225>

Singh, S. T., Kamilya, D., Kheti, B., Bordoloi, B., & Parhi, J. (2017). Paraprobiotic preparation from *Bacillus amyloliquefaciens* FPTB16 modulates immune response and immune relevant gene expression in *Catla catla* (Hamilton, 1822). *Fish & Shellfish Immunology*, 66, 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.005>

Swain, H. S., Baisakhi, B., Ramteke, M. H., Kumar, V., & Upadhyay, A. (2023). Application of probiotics in aquaculture. In: *Biotechnological Tools in Fisheries and Aquatic Health Management* (pp. 217-230). Singapore: Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-2981-8_11

Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K., Scott, K. P., Holscher, H. D., Azad, M. B., Delzenne, N. M., & Sanders, M. E. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(11), 687-701. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0344-2>

Szajewska, H., & Vinderola, G. (2024). Current regulatory issues for the use of probiotics. In: Guandalini, S., Indrio, F. (eds) *Probiotics and Child Gastrointestinal Health. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1449. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-58572-2_12

Tachibana, L., Telli, G. S., de Carla Dias, D., Goncalves, G. S., Ishikawa, C. M., Cavalcante, R. B., Natori, M. M., Hamed, S. B., & Ranzani-Paiva, M. J. T. (2020). Effect of feeding strategy of probiotic *Enterococcus faecium* on growth performance, hematologic, biochemical parameters and non-specific immune response of *Nile tilapia*. *Aquaculture Reports*, 16, 100277. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100277>

Tao, L. T., Lu, H., Xiong, J., Zhang, L., Sun, W. W., & Shan, X. F. (2024). The application and potential of postbiotics as sustainable feed additives in aquaculture. *Aquaculture*, 741237. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741237>

Tapia-Paniagua, S. T., Chabrilón, M., Díaz-Rosales, P., de la Banda, I. G., Lobo, C., Balebona, M. C., & Moriño, M. A. (2010). Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbial Ecology*, 60, 310-319. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9680-z>

Tapia-Paniagua, S. T., Díaz-Rosales, P., de la Banda, I. G., Lobo, C., Clavijo, E., Balebona, M. C., & Moriño, M. A. (2014). Modulation of certain liver fatty acids in *Solea senegalensis* is influenced by the dietary administration of probiotic microorganisms. *Aquaculture*, 424, 234-238. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.003>

Tapia-Paniagua, S. T., Vidal, S., Lobo, C., de la Banda, I. G., Esteban, M. A., Balebona, M. D. C., & Moriño, M. A. (2015). Dietary administration of the probiotic SpPdp11: effects on the intestinal microbiota and immune-related gene expression of farmed *Solea senegalensis* treated with oxytetracycline. *Fish & Shellfish Immunology*, 46(2), 449-458. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.07.007>

Tapia-Paniagua, S. T., Vidal, S., Lobo, C., Prieto-Álamo, M. J., Jurado, J., Cordero, H., Cerezuela, R., García de La Banda, I., Esteban, M. A., Balebona, M. C., & Moriño, M. A. (2014). The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 209-221. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.019>

Tapia-Paniagua, S., Lobo, C., Moreno-Ventas, X., de la Banda, I. G., Moriño, M. A., & Balebona, M. C. (2014). Probiotic supplementation influences the diversity of the intestinal microbiota during early stages of farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Marine Biotechnology*, 16, 716-728. <https://doi.org/10.1007/s10126-014-9588-6>

Taverniti, V., & Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes & Nutrition*, 6(3), 261-274. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0218-x>

Teame, T., Wu, X., Hao, Q., Ding, Q., Liu, H., Ran, C., Yang, Y., Xia, L., Wei, S., Zhigang, Z., Zhang, Y., & Zhang, Z. (2020a). Dietary SWF® enhanced growth performance and disease resistance in hybrid sturgeon (*Acipenser baerii* x *Acipenser schrenckii*) mediated by the gut microbiota. *Aquaculture Reports*, 17, 100346. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100346>

Teame, T., Wang, A., Xie, M., Zhang, Z., Yang, Y., Ding, Q., Gao, C., Olsen, R. E., Ran, C., & Zhou, Z. (2020b). Paraprobiotics and postbiotics of probiotic *Lactobacilli*, their positive effects on the host and action mechanisms: A review. *Frontiers in Nutrition*, 7, 570344. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.570344>

Tegegne, B. A., & Kebede, B. (2022). Probiotics, their prophylactic and therapeutic applications in human health development: A review of the literature. *Heliyon*, 8(6). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09725>

Thoda, C., & Touraki, M. (2023). Immunomodulatory properties of probiotics and their derived bioactive compounds. *Applied Sciences*, 13(8), 4726. <https://doi.org/10.3390/app13084726>

Thorakkattu, P., Khanashyam, A. C., Shah, K., Babu, K. S., Mundanat, A. S., Deliephan, A., Deokar, G. S., Santivarangkna, C., & Nirmal, N. P. (2022). Postbiotics: current trends in food and pharmaceutical industry. *Foods*, 11:3094. <https://doi.org/10.3390/foods11193094>

Torres-Maravilla, E., Parra, M., Maisey, K., Vargas, R. A., Cabezas-Cruz, A., Gonzalez, A., Tello, M., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2024). Importance of probiotics in fish aquaculture: Towards the identification and design of novel probiotics. *Microorganisms*, 12(3), 626. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030626>

Vallejo-Cordoba, B., Castro-López, C., García, H. S., González-Córdova, A. F., & Hernández-Mendoza, A. (2020). Postbiotics and paraprobiotics: A review of current evidence and emerging trends. *Advances in Food and Nutrition Research*, 94, 1-34. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2020.06.001>

Van den Nieuwboer, M., Brummer, R. J., Guarner, F., Morelli, L., Cabana, M., & Claassen, E. (2015). The administration of probiotics and synbiotics in immune compromised adults: is it safe? *Beneficial Microbes*, 6(1), 3-17. <https://doi.org/10.3920/BM2014.0079>

Van Doan, H., Hoseinifar, S. H., Ringø, E., Ángeles Esteban, M., Dadar, M., Dawood, M. A., & Faggio, C. (2020). Host-associated probiotics: a key factor in sustainable aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 28(1), 16-42. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1643288>

Vera-Santander, V. E., Hernández-Figueroa, R. H., Jiménez-Munguía, M. T., Mani-López, E., López-Malo, A. (2023). Health benefits of consuming foods with bacterial

probiotics, postbiotics, and their metabolites: A Review. *Molecules*, 28, 1230. <https://doi.org/10.1039/D4FB00061G>

Vera-Santander, V. E., Mani-López, E., López-Malo, A., & Jiménez-Munguía, M. T. (2024). Use of whey for a sustainable production of postbiotics with potential bioactive metabolites. *Sustainable Food Technology*, 2(4), 1101-1112. <https://doi.org/10.3390/molecules28031230>

Vidal, S., Tapia-Paniagua, S. T., Moriñigo, J. M., Lobo, C., de la Banda, I. G., del Carmen Balebona, M., & Moriñigo, M. Á. (2016). Effects on intestinal microbiota and immune genes of *Solea senegalensis* after suspension of the administration of *Shewanella putrefaciens* Pdp11. *Fish & Shellfish Immunology*, 58, 274-283. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.010>

Vinderola, G., Sanders, M. E., Cunningham, M., & Hill, C. (2024). Frequently asked questions about the ISAPP postbiotic definition. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1324565. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1324565>

Wang, J., Li, S., Jian, Y., Song, J., Zheng, J., Zhou, D., Kong, Y., Limbu, S. M., Ye, J., & Ding, Z. (2023). Dietary postbiotics supplementation improves growth, survival rate, antioxidant capacity, non-specific immunity and gut health of juvenile oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). *Aquaculture Reports*, 33, 101771. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101771>

Wang, J., Zhu, Z., Li, R., Wang, X., Leng, X. & Chen, L. (2021b). Impact of supplementary *Lactobacillus casei* K17 on growth and gut health of largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Aquaculture Reports*, 20. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100734>.

Wang, X., Zhang, P., & Zhang, X. (2021). Probiotics regulate gut microbiota: an effective method to improve immunity. *Molecules*, 26(19), 6076. <https://doi.org/10.3390/molecules26196076>

Wei, C., Wang, X., Li, C., Zhou, H., Liu, C., Mai, K., & He, G. (2021). Effects of dietary *Shewanella* sp. MR-7 on the growth performance, immunity, and intestinal microbiota of Pacific white shrimp. *Aquaculture Reports*, 19, 100595. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100595>

WHO, G. S. (2019). Joint FAO/WHO Expert Meeting in collaboration with OIE on Foodborne Antimicrobial Resistance: Role of the Environment, Crops and Biocides.

Xu, Y., Wang, Y., & Lin, J. (2014). Use of *Bacillus coagulans* as a dietary probiotic for the common carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(4), 403-411. <https://doi.org/10.1111/jwas.12139>

Yan, R., Zeng, X., Shen, J., Wu, Z., Guo, Y., Du, Q., Tu, M., & Pan, D. (2024). New clues for postbiotics to improve host health: a review from the perspective of function and

mechanisms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13444>

Yang, G., Jiang, A., Cai, H., You, F., Wu, S., Zhang, Y., Zhang, X., Shen, Y., Chang, X., Hu, W., Li, K. & Meng, X. (2023). Supplementation with *Akkermansia muciniphila* improved glucose metabolism disorder in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 572. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739465>.

Yang, H. L., Sun, Y. Z., Hu, X., Ye, J. D., Lu, K. L., Hu, L. H., & Zhang, J. J. (2019). *Bacillus pumilus* SE5 originated PG and LTA tuned the intestinal TLRs/MyD88 signaling and microbiota in grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & Shellfish Immunology*, 88, 266-271. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.005>

Yeşilyurt, N., Yılmaz, B., Ağagündüz, D., & Capasso, R. (2021). Involvement of probiotics and postbiotics in the immune system modulation. *Biologics*, 1(2), 89-110. <https://doi.org/10.3390/biologics1020006>

Yolmeh, M., Alves, P. C. M., Vilela, M. M. D. S., & Sant'Ana, A. S. (2024). Impacts of ohmic-heating on the surface characteristics, membrane integrity, morphology, and chemical compounds of *Bifidobacterium animalis* paraprobiotic. *Food Bioscience*, 59, 104141. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104141>

Yu, K., Huang, Z., Xiao, Y., & Wang, D. (2022). *Shewanella* infection in humans: epidemiology, clinical features and pathogenicity. *Virulence*, 13(1), 1515-1532. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2117831>

Yu, Z., Hao, Q., Liu, S. B., Zhang, Q. S., Chen, X. Y., Li, S. H., Ran, c., Yang, Y. L., Teame, T., Zhang, Z., & Zhou, Z. G. (2023). The positive effects of postbiotic (SWF concentration®) supplemented diet on skin mucus, liver, gut health, the structure and function of gut microbiota of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with high-fat diet. *Fish & Shellfish Immunology*, 135, 108681. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108681>

Yuhana, M., Asvia, S., Widanarni, W., & Afiff, U. (2024). Improvement in growth, enzyme activity, and gene expression against Edwardsiellosis in African catfish (*Clarias* sp.) with dietary supplementation of euryhaline probiotic and paraprobiotic *Bacillus cereus* BR2. *Aquaculture International*, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s10499-024-01617-x>

Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M., & da Cruz, A. G. (2020). Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*, 32, 103-123. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.009>

Zhang, L., Xu, D., Wang, F. & Zhang, Q. (2019). Antifungal activity of *Burkholderia* sp. HD05 against *Saprolegnia* sp. by 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid. *Aquaculture*, 511. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.06.012>.

Zheng, X., Duan, Y., Dong, H., & Zhang, J. (2020). The effect of *Lactobacillus plantarum* administration on the intestinal microbiota of whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 526. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735331>.

Zucko, J., Starcevic, A., Diminic, J., Oros, D., Mortazavian, A. M., & Putnik, P. (2020). Probiotic–friend or foe? *Current Opinion in Food Science*, 32, 45-49. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.01.007>



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a la información encontrada en la literatura y expuesta anteriormente, se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

1. La ausencia de plásmidos en *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11) refuerza su uso de forma segura como probiótico.
2. Es posible obtener derivados bióticos de SpPdp11 con efectos como paraprobiótico y postbiótico.

Para contrastar estas hipótesis en esta Tesis Doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo 1. Determinación de la presencia o ausencia de plásmidos en la cepa probiótica SpPdp11 en comparación con cepas patógenas y saprófitas del mismo género.

- **Publicación 1.** Marta Domínguez Maqueda, Olivia Pérez Gómez, Ana Grande-Pérez, Consuelo Esteve, Pedro Seoane, Silvana Teresa Tapia-Paniagua, María Carmen Balebona, Miguel Ángel Moriñigo (2022). Pathogenic strains of *Shewanella putrefaciens* contain plasmids that are absent in the probiotic strain Pdp11. *PeerJ* 10:e14248. <https://doi.org/10.7717/peerj.14248>

Objetivo 2. Evaluación de las implicaciones de la administración de la cepa probiótica SpPdp11 como paraprobiótico inactivado por calor sobre la microbiota y la inmunidad intestinal de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) cultivado.

- **Publicación 2.** Marta Domínguez Maqueda; Isabel María Cerezo Ortega, Silvana Teresa Tapia Paniagua, Inés García De la Banda, Xabier Moreno Ventas; Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez, María Carmen Balebona Accino (2021). A Tentative Study of the Effects of Heat-Inactivation of the Probiotic Strain *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on Senegalese Sole (*Solea senegalensis*) Intestinal Microbiota and Immune Response. *Microorganisms*. 9 - 4, pp. 808 - 808. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040808>

Objetivo 3. Análisis del efecto de las condiciones de cultivo del probiótico SpPdp11 sobre su potencial postbiótico.

Subobjetivo 1. Efecto del pienso como sustrato en el potencial postbiótico de SpPdp11.

- **Publicación 3.** Marta Domínguez-Maqueda, Jorge García-Márquez, Silvana T. Tapia-Paniagua, Carmen González-Fernández, Alberto Cuesta, Cristóbal Espinosa-Ruiz, María Ángeles Esteban, Francisco Javier Alarcón, María Carmen Balebona, Miguel Ángel Moriñigo (2023). Evaluation of the differential postbiotic potential of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 cultured in several growing conditions. *Marine Biotechnology*, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s10126-023-10271-y>

Subobjetivo 2. Implicaciones del uso de microalgas y cianobacterias como sustrato y posible factor modulador del potencial postbiótico del probiótico SpPdp11.

- **Publicación 4.** Marta Domínguez-Maqueda, Olivia Pérez-Gómez, Jorge García-Márquez, Cristóbal Espinosa-Ruiz, Alberto Cuesta, María Ángeles Esteban, Francisco Javier Alarcón, Casimiro Cárdenas, Silvana T. Tapia-Paniagua, María Carmen Balebona, Miguel Ángel Moriñigo (2024). Microalgae and cyanobacteria as microbial substrate and their influence on the potential postbiotic capability of a bacterial probiotic. *Microbial Biotechnology*, 17(11), e70046. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.70046>

Objetivo 4. Efecto modulador de los productos extracelulares (ECP) de SpPdp11 sobre la transcripción del gen codificante de la toxina Aip56 del patógeno piscícola *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* cepa Lg 41/01.

- **Publicación 5.** Marta Domínguez-Maqueda, Cristóbal Espinosa-Ruiz, María Ángeles Esteban, Francisco Javier Alarcón, Silvana T. Tapia-Paniagua, María Carmen Balebona, Miguel Ángel Moriñigo (2024). An *ex vivo* approach in European seabass leucocytes supports the *in vitro* regulation by postbiotics of Aip56 gene expression of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10255-x>

RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL

1. ¿Es relevante la presencia de plásmidos en las bacterias probióticas?

Los microorganismos destinados a ser utilizados como nuevas cepas probióticas deben ser caracterizados de forma exhaustiva considerando criterios fenotípicos y genotípicos, así como pruebas que respalden su seguridad y eficacia, tanto *in vitro* (toxicidad, resistencia a bilis, adhesión, etc.) como *in vivo* (mediante el uso de animales modelo) para ser finalmente respaldados y validados por ensayos clínicos (de Melo Pereira et al., 2018). Esta evaluación no incluye una hoja de ruta específica debido a la falta de estandarización en lo relacionado a la seguridad de los probióticos; no obstante, la secuenciación del genoma completo (WGS), entendido como el conjunto completo de ADN dentro de un organismo e incluyendo material extracromosómico como pueden ser los plásmidos (Uelze et al., 2020), es un criterio bien valorado a la hora de incluir una nueva cepa como candidata a probiótico (Peng et al., 2022).

En estudios previos realizados con la cepa *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11), Seoane et al. (2019) buscaron, compararon y determinaron mediante un flujo de trabajo bioinformático denominado Tarsynflow, clústers de genes de carácter probiótico presentes en la cepa SpPdp11 y ausentes en otras shewanellas patógenas y saprófitas de la misma especie gracias a la secuenciación y anotación previa de los WGS de todas ellas. Sin embargo, en este estudio no se tuvo en cuenta la información contenida en el material extracromosómico que podían tener estas cepas. Por este motivo, el primer objetivo de la tesis y la **Publicación 1** se centran en evaluar y comparar la presencia o ausencia de plásmidos en la cepa probiótica SpPdp11 y shewanellas de la misma especie, concretamente 5 cepas patógenas: *S. putrefaciens* SH4, SH6, SH9, SH12 y SH16, y dos cepas saprófitas: *S. putrefaciens* SdM1 y SdM2. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de plásmidos en dos de las cepas patógenas, SH4 y SH12, y la ausencia de los mismos en el resto de cepas de estudio, incluyendo la cepa probiótica SpPdp11.

Los plásmidos son segmentos de ADN bicatenario extracromosómicos transmisibles que se replican de forma autónoma dentro de una célula hospedador y que se asocian en la mayoría de los casos con genes beneficiosos para la supervivencia de la bacteria hospedadora como pueden ser: factores metabólicos y de virulencia, resistencia a antibióticos y metales pesados, genes para la adaptabilidad y persistencia ambiental, etc. (Balbuena-Alonso et al., 2022). De esta forma, tras detectar los plásmidos en las cepas

patógenas *S. putrefaciens* SH4 (pSH4) y SH12 (pSH12) se llevó a cabo su secuenciación y posterior ensamblaje con ayuda de un flujo de trabajo, desarrollado en esta tesis doctoral y detallado en la **Publicación 1**. Este flujo de trabajo es capaz de integrar secuencias Sanger (primera generación) y secuencias Illumina (próxima generación; NGS). La NGS es la técnica más reciente usada en la secuenciación de nuevos plásmidos; sin embargo, se han documentado dificultades en las herramientas disponibles para ensamblar las NGS y tipificar *in silico* plásmidos a partir de datos de WGS (Tian et al., 2024). Por ello, el flujo del presente trabajo captura las secuencias Illumina del WGS de las cepas SH4 y SH12, disponibles en las bases de datos, y las integra y alinea con las secuencias Sanger. Aunque la NGS ofrece ventajas de alto rendimiento, la secuenciación Sanger sigue manteniendo su relevancia para validar resultados de NGS debido a su reconocida precisión, especialmente en trabajos rutinarios de ADN sintético o de bajo volumen (Al-Shuhaib et al., 2023). De esta forma se establece un método de validación de plásmidos minucioso y robusto. Los rápidos avances en metagenómica están permitiendo desarrollar actualmente técnicas basadas en aprendizaje automático (*machine learning*) combinadas con técnicas convencionales, como la alineación de secuencias en PLASMe (Xubo et al., 2023) o basadas en información sobre el perfil genético del microorganismo en PlasmidHunter (Tian et al., 2024) entre otras, que superan técnicas ya existentes y que también permiten obtener resultados de manera eficaz.

Una correcta secuenciación y caracterización de los plásmidos permite obtener un perfil plasmídico que, en función del tipo de plásmido, el número y el tamaño de los mismos, permite en muchos casos tipificar y discriminar entre aislados bacterianos o cepas relacionadas (Vivas y Gutiérrez, 2019). No obstante, la exposición a la pérdida o adquisición de plásmidos o genes codificados en ellos que presentan los microorganismos dificulta la reproducibilidad, haciendo que esta técnica por sí sola no sea la más eficiente a la hora de tipificar (Balbuena-Alonso et al., 2022). En este sentido, el trabajo recogido en la **Publicación 1** realiza una comparación a nivel genómico, además de plasmídico, lo que permitió sugerir que ambas cepas, SH4 y SH12, parecen ser clones con pequeñas diferencias. Concretamente, los plásmidos de *S. putrefaciens* SH4 (pSH4) y SH12 (pSH12) presentan tamaños distintos, con 3003 pares de bases (pb) en pSH4 y 2960 pb en pSH12, diferencia atribuida a una interrupción de 43 pb en el gen que codifica la proteína RepB en pSH4. Con esto podría sugerirse que dicho plásmido habría sufrido una escisión o pérdida de un gen posiblemente por transferencia horizontal asociada a algún

elemento génico móvil (MGE), provocando la interrupción del gen *repB*. Las proteínas Rep participan en la replicación y transferencia conjugativa de plásmidos (Stolz, 2014). Algunas cepas bacterianas necesitan los productos del operón completo *RepABC* para la replicación de su plásmido (Frimodt-Møller et al., 2024); sin embargo, estas proteínas por separado también pueden reclutar ADN polimerasas y helicasas del hospedador bacteriano para la replicación del plásmido (San Millan y Craig Maclean, 2019), por lo que las cepas SH4 y SH12 podrían utilizar este mecanismo para replicarse.

Además, se detectó un gen que codifica la toxina de un sistema toxina-antitoxina tipo 2 conocida como PemK/PemI, igualmente asociado a MGE como plásmidos y profagos (Bukowski et al., 2019). Sin embargo, no se identificó la antitoxina de este sistema, sugiriendo que no sea funcional o bien se trate de una proteína o ARN no codificado. Por lo tanto, serán necesarios estudios futuros para determinar la funcionalidad de los plásmidos en cuanto a su capacidad de replicación, por ejemplo, mediante un control dinámico del número de copias del plásmido, facilitando una regulación flexible del o los genes de interés, es decir, del circuito genético instalado en el plásmido (Wang et al., 2024).

En cualquier caso, los plásmidos son MGE por excelencia y se consideran un vehículo natural de transferencia de genes, especialmente de resistencia a antibióticos, por lo que su caracterización es importante a la hora de valorar la seguridad de un candidato a probiótico (Moradi et al., 2021). No obstante, hay probióticos que presentan plásmidos, como algunas especies de *Lactobacillus* y *Enterococcus* (Ma et al., 2023; Radovanovic et al., 2022) y, aunque la resistencia a antibióticos no es un factor de virulencia como tal, su detección es crucial para el control y la prevención de la transmisión de dicha resistencia a otros microorganismos que puedan ser patógenos (Zielińska et al., 2018). Son varios los estudios que describen la resistencia de determinadas bacterias ácido lácticas (BAL) probióticas a diferentes grupos de antibióticos como tetraciclinas, aminoglucósidos o glicopéptidos, habiendo posibilidad de transferencia a otras bacterias patógenas o no patógenas de la microbiota intestinal. Ello supone un riesgo en cuanto a resistencia a antimicrobianos, así como la posible expansión del resistoma en el tracto gastrointestinal (TGI) (Radovanovic et al., 2023). Esto ocurre en multitud de sectores que emplean probióticos, incluido el sector acuícola, donde también se ha descrito el uso de probióticos con plásmidos asociados a genes de resistencia a antimicrobianos. Por ejemplo, Adel y Dawood, 2021 describieron cómo *Vibrio alginolyticus*, una bacteria

marina que se administró como probiótico para el cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), portaba genes de resistencia a antibióticos que se detectaron tanto en el intestino del hospedador como en el agua de cultivo. En este sentido, la ausencia de plásmidos en SpPdp11 minimizaría el riesgo que supone la transferencia horizontal de resistencia a los antimicrobianos u otros posibles factores de virulencia asociados a la presencia de MGE, y más específicamente a los plásmidos, reforzando así su valor como probiótico.

Junto a las estrategias tradicionales de desarrollo de nuevos probióticos, en los últimos años se investiga y busca soluciones a las limitaciones de los mismos mediante técnicas de ingeniería genética que resultan en probióticos modificados genéticamente (PMG). Recientemente también se está apostando por el estudio de nuevas cepas bacterianas aisladas de la misma especie en que se piensa usar y se denominan probióticos de nueva generación (NGP) (Murali y Mansell, 2024). Sin embargo, el hecho de emplear PMG y NGP plantea preocupaciones en cuanto a la seguridad, posibles riesgos asociados con la liberación de microorganismos modificados genéticamente (OMG) en el medio ambiente y su uso en seres humanos, además de problemas legislativos (Lerner et al., 2024). Por todo esto, cada vez son más los estudios que plantean una búsqueda de alternativas más seguras y efectivas, como el uso de derivados bióticos, tales como paraprobióticos y postbióticos.

2. SpPdp11 como paraprobiótico inactivado por calor, ¿modula la microbiota y la inmunidad intestinal en *Solea senegalensis*?

Como se ha expuesto previamente, el concepto de probiótico implica la viabilidad del microorganismo, lo que conlleva una serie de limitaciones y riesgos inherentes a la administración de células vivas en la dieta. Por el contrario, en el caso del paraprobiótico, son células microbianas no viables (intactas o rotas) que, administrados en la dieta en cantidades adecuadas, confieren un beneficio al hospedador (Taverniti y Guglielmetti, 2011). Para la obtención de estas células microbianas no viables se emplean multitud de métodos de inactivación, de forma que se mantengan al menos en su mayoría, los beneficios que tenían como células viables (Yolmeh et al., 2024). Algunos de los métodos más habituales, especialmente en el sector de la acuicultura, son la inactivación por calor, el tratamiento con radiación ultravioleta (UV), la inactivación por formalina y la

sonicación, entre otros (Li y Tran, 2022). Como se ha mencionado anteriormente, de todos los posibles métodos, la inactivación por calor, aplicando altas temperaturas durante un periodo de tiempo determinado, es el método más comúnmente utilizado (Choudhury y Kamilya, 2019). De hecho, el primer trabajo que estudia los paraprobióticos en acuicultura, inactiva por calor una cepa probiótica de *Lactococcus lactis*, observando posteriormente efectos inmunomoduladores en trucha (*Oncorhynchus mykiss*) (Villamil et al., 2002). Desde entonces, han sido muchos los trabajos que emplean el calor para la inactivación de probióticos, y actualmente es un método que se sigue utilizando, puesto que es una técnica bien estandarizada y que supone un bajo coste (Shawky et al., 2023; Rocha et al., 2023; Neissi et al., 2024; Mudaliar et al., 2024).

Nuestro grupo de investigación evaluó inicialmente el efecto de la administración en la dieta de SpPdp11 inactivado por calor en doradas cultivadas (*S. aurata*), obteniendo resultados que muestran una modulación de su sistema inmune (Díaz-Rosales et al., 2006). Sin embargo, no se había estudiado el empleo de SpPdp11 como paraprobiótico en otra especie de interés en la acuicultura como es el lenguado senegalés (*S. senegalensis*), una especie en la que SpPdp11 ya había demostrado ejercer efectos beneficiosos como probiótico. Por ello, este capítulo de tesis, cuyos resultados se muestran en la **Publicación 2**, evalúa el efecto de administrar al lenguado senegalés SpPdp11 como paraprobiótico a través de la dieta. Así, se emplearon células inactivadas por calor (dieta I) y se estudió su efecto sobre el crecimiento de los lenguados, así como en la modulación de la microbiota y la respuesta inmune intestinal. A su vez, dichos efectos se compararon los obtenidos tras la administración de SpPdp11 como probiótico vivo (dieta P) y una dieta control (dieta C).

En los peces, el canal alimentario posgástrico tiene una función primaria en la digestión y absorción de los nutrientes de la dieta. Luego, cada región a lo largo del intestino posee especializaciones en las mucosas que maximizan la eficiencia de la secreción, absorción y función digestiva en cada sección del intestino (Arellano et al., 2022). Son muchos los estudios que dividen el intestino de los peces cultivados en sección anterior y posterior (Verdile et al., 2020; Cerezo et al., 2022; Goncalves et al., 2024) e incluso sección anterior, media y posterior (Pereira et al., 2020; Han et al., 2022; Wang et al., 2023), para estudiar efectos de la dieta en cuanto a histología, morfología, microbiota o digestibilidad de nutrientes. Concretamente en *S. senegalensis* se han observado unas variaciones en el pH del intestino desde la zona anterior a la posterior del intestino (Yúfera y Darias, 2007),

además de cambios a nivel morfológico e histológico (Arellano et al., 2022). En este sentido, y en consonancia con estudios previos (Tapia-Paniagua et al., 2019; Cerezo et al., 2022; Cerezo Ortega, 2024), en esta tesis se discrimina entre intestino anterior (IA) e intestino posterior (IP) en *S. senegalensis* en función de la zona más cercana al estómago y al recto, respectivamente.

El aumento en las tasas de crecimiento de especies cultivadas tras la administración de paraprobióticos se ha relacionado con la secreción de enzimas intestinales que mejoran la asimilación de nutrientes, y por ende la eficiencia en la digestión y la modulación de la microbiota bacteriana intestinal (Zhang et al., 2024). Aunque la administración de SpPdp11 como paraprobiótico en nuestro estudio no favoreció el crecimiento de *S. senegalensis*, tampoco implicó pérdidas en su peso.

Por el contrario, sí que hubo modulación en la microbiota bacteriana intestinal en los peces que recibieron la dieta paraprobiótica. En orden de abundancias, los filos *Proteobacteria* (actualmente *Pseudomonadata*), *Tenericutes* (actualmente *Bacillota*) y *Spirochaetota* son ampliamente reconocidos por formar parte de la microbiota bacteriana intestinal en multitud de especies de peces incluido *S. senegalensis*, tal y como se describe en diferentes trabajos realizados administrando diferentes dietas que incluyen la macroalga *Ulva ohnoi* (Tapia-Paniagua et al., 2019; Cerezo et al., 2022), una suplementación de vitamina K1 (Acosta et al., 2022) y, más recientemente, tras la administración de SpPdp11 inactivado por sonicación (Cerezo Ortega, 2024). Sin embargo, en el presente trabajo el orden de abundancia de los filos descritos anteriormente, únicamente coincide con la microbiota observada en el IA tras administración de la dieta P. Tanto en el IP como en ambas secciones intestinales, tras la administración de las dietas C e I, el filo más abundante fue *Spirochaetota*, seguido de *Tenericutes* y por último *Proteobacteria*.

En los lenguados que recibieron el paraprobiótico SpPdp11 se observaron unas elevadas abundancias de miembros de la familia *Brevinemataceae* y del género *Brevinema* en ambas secciones intestinales (50 % en IA y en torno al 75 % en IP). Este aumento en la abundancia de *Spirochaetota* y con ello *Brevinema*, ocurre generalmente, aunque no de forma tan acusada, en *S. senegalensis* según los trabajos mencionados anteriormente. Estudios recientes sugieren aumentos en la abundancia de *Brevinema* especialmente en organismos carnívoros cultivados que han recibido una dieta baja en proteínas, como describe Singh et al. (2024) en salmón (*Salmo salar*) o Xu et al. (2024) en trucha

(*Oncorhynchus mykiss*). *Brevinema* se relaciona además con una mejora en la utilización de carbohidratos complejos en el intestino (Xu et al., 2022) y una producción de productos derivados de la fermentación, como el butirato, que favorecen la integridad y homeostasis intestinal (Domingo-Bretón et al., 2024) implicando todo ello, una mejora de la inmunidad intestinal (Sandbakken et al., 2024).

Por otro lado, tras la administración de SpPdp11 como paraprobiótico se observa la misma tendencia con respecto al índice *Proteobacteria/Firmicutes* que describe Cerezo Ortega, (2024) en lenguados alimentados con una dieta suplementada con células de SpPd11 sonicadas. Estos resultados, donde la abundancia relativa del filo *Proteobacteria* disminuye mientras que el filo *Firmicutes* (actualmente *Bacillota*) aumenta, se han asociado con un menor estado inflamatorio y una mejora del estado intestinal en los ejemplares de *S. senegalensis* (Cerezo Ortega, 2024). El filo *Firmicutes* está relacionado con la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y la formación de gotas lipídicas que mejoran la absorción en el epitelio intestinal (Zhou et al., 2023). Además, multitud de microorganismos probióticos, incluidas bacterias ácido lácticas (BAL) y del género *Bacillus*, pertenecen a este filo. Resultados similares se han descrito recientemente en especímenes de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) (Chouayekh et al., 2023) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Zhao et al., 2024), sugiriendo en ésta última los cambios en la abundancia del filo *Firmicutes* como un indicador del estado disfuncional intestinal de los peces.

A nivel de familia, el IA de los ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con la dieta P mostró una dominancia de grupos taxonómicos similar a la observada en otros estudios realizados con células vivas de Pdp11 (Tapia-Paniagua et al., 2019; Cerezo et al., 2022), así como inactivadas por sonicación (Cerezo Ortega, 2024), siendo los géneros predominantes *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Mycoplasma* y *Acinetobacter*. No obstante, tras la administración de la dieta I, se produce una drástica disminución de la diversidad, con una clara dominancia de los géneros *Brevinema* y *Mycoplasma* en el IA, y *Brevinema* y *Vibrio* como únicos representantes en el IP. Además, cabe destacar que la familia *Vibrionaceae*, sólo fue detectada en la microbiota de especímenes de *S. senegalensis* alimentados con la dieta I. Tanto *Vibrio* como *Mycoplasma* forman parte de la microbiota intestinal de *S. senegalensis*. *Vibrio* juega un papel predominante en la microbiota de *S. senegalensis*, al asociarse su presencia a una contribución en la digestión mediante la producción de enzimas hidrolíticas (Ray et al., 2012; Cerezo et al., 2022). Por su parte,

Mycoplasma se considera miembro o incluso simbiote en multitud de teleósteos, especialmente en salmónidos donde ha demostrado ejercer un papel importante en el metabolismo de lípidos y bienestar de los peces, sugiriéndose como un biomarcador del estado de la enfermedad (Rasmussen et al., 2023; Brealey et al., 2024).

Puesto que la dieta modula la microbiota bacteriana intestinal y ésta desempeña un papel importante en la inmunidad intestinal, cabe esperar que la dieta tenga también efectos sobre esta inmunidad (Li y Tran, 2022). En nuestro estudio, con respecto a los genes relacionados con la respuesta inmune humoral, únicamente se observaron diferencias significativas en la transcripción del gen *c3*, con una disminución de su transcripción relativa en el IA de los ejemplares que recibieron la dieta I, y en el IP de los que recibieron tanto la dieta I como la dieta P, en comparación con la dieta C. El sistema del complemento se asocia con multitud de funciones inmunitarias, y específicamente la fracción del complemento C3 es responsable de funciones como la eliminación de patógenos y la promoción de respuestas inflamatorias (Medina et al., 2023; Schulz et al., 2024). Por otro lado, también se observó una disminución significativa en la transcripción de los genes relacionados con el estrés celular *hsp90ab* y *gp96* tras la administración de la dieta I o P. La sobreexpresión de estos genes se observa cuando se somete a los peces a factores de estrés, como aumentos de temperatura en el cultivo de trucha (*O. mykiss*) (Zhao et al., 2024) o condiciones de hipoxia descritas en tilapia (*Nile tilapia*) (Elbahnaswy et al., 2024). Estos resultados sugieren que *S. senegalensis* no está sometido a ningún tipo de estrés, y que las dietas administradas no le afectan en este sentido. Estos resultados están en consonancia con la modulación de la microbiota bacteriana intestinal descrita, puesto que no hay una representación de microorganismos que puedan ser perjudiciales. De hecho, esta microbiota está representada en su mayoría por el género *Brevinema*, relacionado con multitud de funciones beneficiosas en peces como se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, se observó un aumento significativo en la expresión de genes que codifican proteínas receptoras de antígenos, asociadas a linfocitos T citotóxicos (*cd8a*) o T helper (*cd4*) en el IA para ambas dietas, P e I. Contrariamente esta expresión disminuyó significativamente en el IP para ambas dietas. Por otra parte, el gen, *il-1β* aumentó significativamente su transcripción en el IP tras la administración de la dieta P. Estos genes se suelen transcribir cuando hay alguna infección o un daño (Ruiz et al., 2023; Stosik et al., 2023), desempeñando un importante papel regulador en la respuesta inmune (Stosik et al., 2023). Además, están descritas variaciones en su transcripción tras la

administración de diferentes dietas a peces, modulando su microbiota bacteriana intestinal y la expresión génica en cuanto a inmunidad intestinal como ocurre en *D. labrax* (Abdel-Latif et al., 2021) y pez cabeza de serpiente (*Channa micropeltes*) (Liu et al., 2023) cuando se reemplaza su pienso de harina de pescado por harina de insecto, o en dorada (*S. aurata*) cuando se suplementa la dieta con sales biliares (Ruiz et al., 2023). En este contexto, y dada la capacidad moduladora de la microbiota por parte de las dietas I y P, se puede considerar que el sistema inmune intestinal podría presentar un estado activo o de alerta debido a la modulación y variaciones en la abundancia de la microbiota bacteriana intestinal, que no parece afectar ni comprometer negativamente el estado inmune y la salud de los peces. En este sentido, Cerezo Ortega, (2024) describió cómo a nivel histológico la administración de SpPdp11, como probiótico inactivado por sonicación estabiliza el intestino, favoreciendo también la expresión de genes relacionados con la salud intestinal. Así, se observa una regulación positiva en la ruta primaria de los ácidos biliares, las vías de señalización del receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR) y la interacción de receptores de la matriz extracelular (ECM). En conjunto esta activación se asocia con una adecuada inclusión de colesterol en el organismo, una mejora en el metabolismo de los lípidos, la adsorción intestinal y un posible papel antimicrobiano (Cerezo Ortega, 2024).

En nuestro estudio, la administración en la dieta de SpPdp11 inactivado por calor no afecta el crecimiento de *S. senegalensis*; sin embargo, parece modular la microbiota bacteriana intestinal sin comprometer la inmunidad intestinal, observándose efectos similares a los que ejercería SpPdp11 administrado como células viables. Estos resultados además se confirman con estudios más recientes, donde se administra SpPdp11 inactivado por sonicación (Cerezo Ortega, 2024). Una segunda alternativa al uso de probióticos como células viables es el empleo de fracciones celulares o compuestos derivados del metabolismo del microorganismo. De esta forma se abren las puertas a un campo de investigación más amplio como es el de los postbióticos, cuyo potencial y posibilidad de modulación en el probiótico SpPdp11 no se ha evaluado hasta el momento.

3. Potencial postbiótico del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11).

Influencia de las condiciones de cultivo

De acuerdo con la definición de la ISAPP, se pueden utilizar numerosos procesos para obtener derivados postbióticos y la composición de los mismos puede ser muy variada. Además, actualmente no hay una estandarización de los métodos de preparación y análisis de los postbióticos, ni tampoco de los factores que afectan a su producción, lo que supone un reto en su comprensión, investigación y aplicación en la industria (Moradi et al., 2021). Podemos encontrar postbióticos que consisten en una mezcla de derivados, procedentes de uno o varios microorganismos, o bien otros que son derivados microbianos individuales. Por ejemplo, hay postbióticos consistentes en productos del metabolismo purificados, como ocurre con el ácido butírico de algunas BAL y que pueden presentar una marcada actividad antifúngica (Mani-López et al., 2022). Pero también pueden estar compuestos por sobrenadante libre de células (CFS) de varios microorganismos, como el postbiótico comercial Hylak® forte, que se obtiene a partir de los microorganismos *Enterococcus faecalis* DSM 4086, *Lactobacillus acidophilus* DSM 4149, *Lactobacillus helveticus* DSM 4183 y *Escherichia coli* DSM 4087, y que contiene ácido acético, ácidos grasos de cadena corta, ácido glutámico, ácido fórmico, riboflavina y glutamina, presentando una actividad antimicrobiana de amplio espectro (Moradi et al., 2021).

En el presente capítulo de tesis (**Publicaciones 3 y 4**) se han ensayado como postbióticos los productos extracelulares (ECP) de las células del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11). Los ECP se obtienen mediante una técnica descrita por Liu et al. (1957), empleando hojas de papel de celofán estériles sobre medio de cultivo sólido, con la intención de recoger los compuestos con posible valor postbiótico secretados por el microorganismo probiótico. Es una técnica ampliamente utilizada para la obtención de metabolitos (Breitenbach et al., 2022), vesículas extracelulares (De Vallée et al., 2023) y productos extracelulares (García-Márquez et al., 2024). Diversos autores han valorado positivamente el empleo de los ECP como postbióticos. Así, Yuan et al. (2021) describen cómo los ECP de *Escherichia coli* modulan la expresión diferencial de genes relacionados con el *quorum-sensing* (QS) en *Pseudomonas aeruginosa*, al igual que los ECP de *P. aeruginosa* inhiben el crecimiento de *E. coli*. De forma similar, se ha observado que ECP aislados de *Bacillus pumilus* presentan diferentes patrones de degradación de compuestos nutricionales y antinutricionales, de hidrólisis de proteínas y de efecto antibacteriano evaluados de forma *in vitro*, además de favorecer la digestibilidad en juveniles de doradas

cultivadas (*S. aurata*) *in vivo* (García-Márquez et al., 2024). Por consiguiente, sería sugerente pensar que el potencial postbiótico de los ECP de SpPdp11 puede modularse y presentar un amplio rango de actividades en base a sus condiciones de cultivo.

El mecanismo de preparación y obtención de postbióticos determina su bioactividad, influyendo varios factores como la elección de las cepas bacterianas, los medios de cultivo, los métodos de tratamiento bacteriano y la fase de crecimiento (Garnier et al., 2019; Moradi et al., 2021; Chang et al., 2021). Postbióticos derivados de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 mostraron diferentes propiedades bioactivas, composición química y toxicidad si se obtenían de medio comercial Man, Rogosa y Sharpe (MRS) o medio compuesto por suero de leche (Nasri et al., 2024). Por otro lado, postbióticos derivados de *Lactiplantibacillus plantarum* PTCC1745 presentaron diferentes propiedades antibacterianas y antifúngicas si el medio de cultivo se componía de leche o suero (Khakpour et al., 2024). Otros autores han observado cómo diferentes combinaciones de fuentes de carbono y nitrógeno influyen en el crecimiento y las características de los posbióticos producidos por una variedad de cepas (RG11, RG14, RI11, RS5, TL1 y UL4) de *L. plantarum*, que mostraron propiedades antioxidantes y antimicrobianas en función del sustrato empleado (Zheng et al., 2024). En base a estos conocimientos, en esta tesis se modifican las condiciones de cultivo de SpPdp11 mediante variaciones del sustrato, salinidad, temperatura y tiempo de incubación, evaluándose la influencia en la secreción de los ECP, y con ello la capacidad de modular su potencial postbiótico. Los ECP obtenidos y con los que se trabaja presentan una nomenclatura específica que se detalla en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Nomenclatura utilizada para designar las condiciones de obtención de los ECP en las Publicaciones 3 y 4.

T (°C)	Tiempo de incubación (h)	Medios de cultivo				
		Publicación 3			Publicación 4	
		T	F	FS	FM	M
23	24	T2324	F2324	FS2324	FM2324	M2324
23	48	T2348	F2348	FS2348	-	-
15	24	T1524	F1524	FS1524	FM1548	M1548
15	48	T1548	F1548	FS1548	-	-

T: agar triptona de soja suplementado con NaCl (1.5 %) (TSAs)

F: agar (1.5 %) y pienso (160 g/L).

FS: agar (1.5 %) y pienso suplementado con NaCl (1.5 %) (160g/L).

FM: agar (1.5 %) y pienso con un reemplazo (25 %) de mix de microalgas (*Chlorella fusca*, *Tisochrysis lutea* y *Microchloropsis gaditana*) y cianobacteria (*Arthrospira platensis*) (160 g/L).

M: agar (1.5 %) y mix de microalgas (*Chlorella fusca*, *Tisochrysis lutea* y *Microchloropsis gaditana*) y cianobacteria (*Arthrospira platensis*) (50 g/L).

3.1. La inclusión de pienso y el suplemento de sal como sustrato para el crecimiento de SpPdp11 y su efecto en la secreción de ECP

3.1.1. El sustrato y las condiciones de cultivo influyen en las actividades hidrolíticas de los ECP de SpPdp11

Existe un interés creciente en el estudio y el uso de enzimas exógenas o extracelulares que descompongan compuestos nutricionales y antinutricionales en dietas para peces, empleándose en algunos casos cantidades significativas de dichas enzimas como complemento alimenticio (Soltan et al., 2023). Las enzimas exógenas pueden alterar el sustrato disponible para determinadas poblaciones de microorganismos intestinales, lo que mejora la digestibilidad de los alimentos y la asimilación de nutrientes (Gopalraaj et al., 2024). Se ha sugerido que la producción de hidrolasas extracelulares esté determinada por las condiciones de cultivo como acidez, temperatura, salinidad, composición del medio utilizado (fuentes de nutrientes) o fase de crecimiento del microorganismo (Valiullin et al., 2024; Gökmen et al., 2024). Es por ello que es muy interesante poder determinar las actividades enzimáticas presentes en los diferentes ECP a estudiar en función de las condiciones de cultivo a las que se somete a SpPdp11.

El sistema APIZYM, usado en esta tesis, permite evaluar un total de 19 actividades enzimáticas extracelulares. Los ECP obtenidos de medio T presentaron el total de actividades, independientemente de la temperatura y el tiempo de incubación. Resultados similares se obtuvieron para los ECP obtenidos de los medios F1524 (18 de las 19 actividades) y F2324 (las 19 actividades). El resto de condiciones no mostraron hidrólisis para 6 o más actividades. Cabe destacar cómo los ECP obtenidos de medio FS, que conlleva un suplemento de NaCl, disminuyen notablemente su capacidad degradativa. Bhimani et al. (2024) demostraron cómo porcentajes mayores de NaCl en el medio disminuían el crecimiento y la secreción enzimática de bacterias aisladas de residuos sólidos orgánicos. Por otro lado, *Lactococcus lactis* Gh1 vio afectado su crecimiento a concentraciones crecientes de NaCl, sugiriendo una afectación de la fisiología, actividad enzimática y metabolismo celular de la bacteria (Jawan et al., 2021). El suplemento de NaCl, junto con la cantidad de sal que incluye el preparado del propio pienso de partida, podría estar influyendo a nivel de regulación osmótica, afectando a la actividad enzimática de los ECP obtenidos de SpPdp11 cultivado en medio FS.

Las actividades enzimáticas que mostraron una mayor modulación fueron fosfatasa alcalina, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, N-acetil-B-glucosaminidasa y esterases C4 y C8. Especies probióticas de *Bacillus* aislados del tracto gastrointestinal (TGI) de *S. aurata* presentaron algunas de estas actividades enzimáticas, siendo asociadas a un importante papel en la digestión y un beneficio nutricional para el hospedador (Elmnasser et al., 2024). SpPdp11 aplicado como probiótico y paraprobiótico ha demostrado ejercer efectos beneficiosos en cuanto a la digestión y asimilación de nutrientes en *S. senegalensis* (Domínguez-Maqueda et al., 2021; Cerezo Ortega, 2024) y *S. aurata* (Cámara-Ruiz et al., 2020). Dado que los postbióticos presentan multitud de actividades presentes en los probióticos de los que proceden (Rafique et al., 2023), tiene sentido pensar que los ECP derivados de SpPdp11, también pueden poseer un perfil de actividades relacionado con un buen estado intestinal.

Con respecto a la capacidad de degradar compuestos nutricionales y antinutricionales, todos los ECP obtenidos hidrolizaron gelatina y todos, excepto T1524, caseína y Tween-80. Sin embargo, únicamente FS2324 y FS2348 presentaron capacidad de hidrolizar almidón, y en ningún caso hubo hidrólisis de celulosa, taninos o fitato. Los resultados obtenidos en cuanto a las actividades degradativas analizadas muestran que los ECP

incluyen multitud de enzimas secretadas que, como se menciona anteriormente, permiten la hidrólisis de diferentes compuestos, lo que podría mejorar y potenciar la actividad de enzimas clave en la digestión del hospedador (García-Márquez et al., 2024). En base a estos resultados, en la **Publicación 3** se valora positivamente aquellos ECP que presentan mayor número de actividades enzimáticas, descartando, por tanto, los ECP obtenidos de medio FS en favor de los obtenidos de medios T y F, especialmente a 23 °C tras 24 h de incubación, y a 15 °C tras 48 h de incubación. Serán necesarios estudios complementarios para evaluar dichos ECP en términos nutricionales, como podría ser su suplementación en ensayos *in vivo* o experimentos de digestión *in vitro*.

3.1.2. Las condiciones de cultivo de SpPdp11 influyen en sus ECP, que exhiben distintas capacidades antagonistas

El efecto antibacteriano asociado a los postbióticos y reflejado en la inhibición del crecimiento de patógenos se relaciona con la presencia de multitud de sustancias que incluyen ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno o determinadas enzimas, entre las que destacan sobre todo bacteriocinas, serinproteasas o exopolisacaridasas (Tao et al., 2024; Zavišić et al., 2024). En este estudio, los ECP obtenidos bajo las diferentes condiciones de cultivo podrían contener algunas de estas sustancias y podrían ser responsables de ejercer un efecto inhibitorio del crecimiento de determinados patógenos piscícolas ensayados. Sin embargo, ninguna condición de ECP ensayada inhibió a los diferentes patógenos piscícolas ensayados en este trabajo (*Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi* 16/00, *Vibrio anguillarum* CECT 522, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* CECT 626 y *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg 41/01, *Tenacibaculum maritimum* CECT 4296, *T. soleae* CECT 7292 y *T. gallaicum* CECT 7122). Hay que tener en cuenta que los distintos patógenos exhiben diferentes sensibilidades a los postbióticos debido a variaciones en la estructura de la pared celular, las bombas de eflujo y otros factores (Quintanilla-Pineda et al., 2023). Además, elementos como la composición del medio de cultivo, el tiempo de incubación y el tamaño y concentración del inóculo del postbiótico pueden afectar su capacidad antibacteriana (Quintanilla-Pineda et al., 2023). En este sentido, Nasaj et al. (2024) demostraron cómo la actividad antimicrobiana del quitosano se veía influenciada por numerosos factores como el pH, la temperatura, la salinidad o el medio en el que se suspende el quitosano. En este trabajo no se ha observado que ninguna de las condiciones de cultivo utilizadas para la obtención de los ECP influya en la ausencia de capacidad antibacteriana, al menos a las concentraciones ensayadas.

Existen otros mecanismos, como puede ser el efecto antibiofilm, y por los cuales los postbióticos también pueden ejercer un efecto antagonista (Khani et al., 2024; Santana et al., 2024). En el trabajo llevado a cabo en esta tesis (**Publicación 3**) sólo se observó interferencia en la formación de biofilm de *V. anguillarum* CECT 522, *T. soleae* CECT 7292 y *T. gallaicum* CECT 7122 tras incubación con los ECP obtenidos a partir de medio T. Por tanto, dado que la interferencia con el biofilm observada con los ECP procedentes de medio comercial no se observó con los ECP obtenidos con el resto de sustratos (medios F y FS), se ha comprobado que este efecto antibiofilm de los ECP se ve influenciado por las condiciones de cultivo, especialmente por el sustrato. En conexión con las actividades hidrolíticas observadas en los ECP, cabe señalar la existencia de mecanismos de eliminación de biofilm de patógenos mediante postbióticos, que interfieren en la adhesión de las células de los patógenos a las superficies por hidrólisis de los biopolímeros que forman dicho biofilm (Che et al., 2024). En esta hidrólisis intervienen enzimas como glicosidasas, lipasas, proteasas, α -amilasa y ADNasas, que pueden degradar biopelículas reguladas por enzimas (Jaffar et al., 2016; De Silva y Heo, 2023).

Otro efecto antibiofilm de los postbióticos se ha relacionado, según Tomé et al. (2023), con interferencias en los mecanismos de *quorum-sensing* (QS) a través de la unión competitiva de inhibidores a las moléculas de señalización de QS o autoinductores (AI), de la degradación enzimática de AI y de la modulación de la transcripción de genes reguladores de QS. En este sentido, Lv et al. (2021) demostraron cómo los postbióticos de *Lactobacillus plantarum* CY 1-1 ejercen un efecto antibiofilm sobre el patógeno piscícola *Aeromonas sobria* debido a una degradación de las Acil-Homoserina Lactonas (AHL) que participan en el mecanismo de QS. Se han realizado estudios *in vitro* que muestran la capacidad de SpPdp11 de interferir en mecanismos QS mediante la degradación de determinadas AHL (Domínguez-Maqueda, 2022). No obstante, es necesario realizar más estudios para evaluar esta capacidad en los ECP de SpPdp11 y su posible implicación en el biocontrol de patógenos y sus factores de virulencia.

3.1.3. Las condiciones de cultivo de SpPdp11 modulan la capacidad antivírica de sus ECP

El efecto antivírico de SpPdp11 o sus ECP se ha estudiado frente al virus de la necrosis nerviosa (NNV) (**Publicación 3**), el agente causal de la encefalopatía y retinopatía viral (Bandín y Souto, 2020). Esta enfermedad se ha detectado en más de 170 especies de peces, tanto salvajes como cultivados, en todos los continentes, y produce grandes pérdidas económicas en el sector acuícola (Bandín y Souto, 2020). Se ha observado que los efectos antivíricos de los ECP estudiados dependen de la temperatura de incubación, con una disminución del título vírico a 15 °C, mientras que una temperatura superior (23 °C) se tradujo en incrementos de los títulos víricos, especialmente por las condiciones F1548 y FS1548. Los mecanismos de acción implicados podrían incluir desde inhibición de transcriptasas inversas (Aghebat-Maleki et al., 2022) hasta bloqueo de la unión viral a los receptores del hospedador (Kalinichenko et al., 2020) o inducción de la expresión de genes que inhiban la síntesis de ARN del virus (Wu et al., 2020), entre otras. Estudios que emplean sobrenadante de la cepa *Shewanella putrefaciens* 0409 demostraron un efecto antivírico *in vitro* debido al contenido en amonio del sobrenadante y a la inducción de la expresión del gen *mx*, que codifica el interferón tipo I (IFN-I), con actividad antiviral (Wu et al., 2021).

Por otro lado, estudios recientes realizados con SpPdp11 sonificado también demostraron *in vitro* un efecto antivírico frente al NNV, y una protección en ensayos realizados con especímenes de lubinas infectadas con NNV (Moreno et al., 2023). Además, en los ensayos *in vitro* se pudo comprobar cómo los extractos de SpPdp11 sonificado ejercen inhibición vírica tras su adición 6 h post adsorción del mismo en la línea celular E-11, pero no mediante la neutralización del virus (Moreno et al., 2023). Estos resultados indican que estos extractos de SpPdp11 sonificado necesitan estar en contacto con las células hospedadoras del virus, induciendo en ellas una respuesta inmune que podría estar involucrada en la actividad antiviral y que afecta principalmente el ensamblaje y/o salida viral. Los ensayos de efecto antivírico en el presente trabajo se obtienen tras la incubación de las células E-11 con NNV y los ECP simultáneamente; sin embargo, sería interesante en un futuro evaluar la actividad antivírica de los diferentes ECP del probiótico SpPdp11 en las diferentes fases del ciclo de infección.

3.1.4. Las condiciones de cultivo de SpPdp11 para la obtención de los ECP influyen en la viabilidad de líneas celulares de peces

Los ensayos en líneas celulares se utilizan para evaluar de forma inicial la seguridad de postbióticos derivados de microorganismos (Di Nunzio et al., 2017). Jalali et al. (2024) evaluaron la seguridad de los postbióticos derivados de *Lacticaseibacillus rhamnosus* LRH-B2 y *Limosilactobacillus reuteri* LRE-B16 mediante ensayos de citotoxicidad en líneas celulares de fibroblastos de pulmón y epiteliales de intestino. Del mismo modo, en la industria acuícola, el empleo de líneas celulares de peces podría ser fundamental para identificar de forma preliminar, factores clave relacionados con la salud y el rendimiento de estos organismos acuícolas, contribuyendo además a la reducción en el número de animales en los ensayos experimentales (Derakhshesh et al., 2017; He et al., 2023). Es por ello, que se consideró indispensable llevar a cabo una evaluación de los posibles efectos citotóxicos de los ECP obtenidos a partir de la cepa probiótica objeto de este estudio. Los resultados obtenidos en diferentes líneas celulares de peces (DLB-1, FuB-1, PLHC-1 y SAF-1) mostraron toxicidad para todas las líneas celulares sólo en los ECP obtenidos a partir de la condición T1548. Simultáneamente se evaluó el efecto citotóxico de los controles internos (CI), donde especialmente los medios F y FS disminuían la viabilidad celular. En este sentido, Elham et al. (2022) analizaron el efecto citotóxico de postbióticos de diferentes cepas *Lactobacillus casei* (RTCC 1296-1, RTCC 1296-2 y RTCC 1296-3) en las líneas celulares de fibroblastos de pulmón humano (MRC-5) y de adenocarcinoma colorrectal (CaCo2), encontrando que el medio MRS utilizado para obtener los postbióticos era citotóxico debido a la presencia de acetato. De esta forma, los medios F y FS, adicionados con pienso acuícola, podrían contener algún compuesto que estuviera influyendo negativamente en la viabilidad celular, resaltando como uno de los más comunes y documentados la presencia de micotoxinas (Marijani et al., 2019; Oliveira et al., 2020; Puvača et al., 2024). De igual forma, muchas de las harinas vegetales que se utilizan en la producción de piensos contienen antinutrientes propios de las plantas (inhibidores de proteasas, fenoles, hemaglutininas, etc.) (Chong, 2022), pudiendo afectar negativamente a las células en el presente estudio. Aunque los piensos se tratan para minimizar estos problemas, estos efectos podrían ser más patentes en estudios *in vitro* controlados, que en situaciones reales como el proceso de digestión del animal. Serán necesarios estudios adicionales para dilucidar la posible composición de metabolitos presentes en los CI.

Por el contrario, los ECP obtenidos a partir de la condición F1524 favorecieron la proliferación celular en todas las líneas celulares ensayadas, incluso mitigando el efecto citotóxico del propio medio de cultivo donde había crecido el probiótico. Además, y en relación con esta capacidad de incrementar la viabilidad celular, Chen et al. (2020) y Cerezo et al. (2023) han informado de que la administración de SpPdp11 en la dieta de doradas cultivadas favoreció la reparación del tejido y cicatrización de heridas en la piel. De esta forma, en el presente capítulo queda patente la influencia de la variación en las condiciones de cultivo a la hora de obtener ECP derivados de SpPdp11, con especial énfasis en los efectos sobre las células del hospedador.

3.2. La inclusión de microalgas y cianobacterias como sustrato para el crecimiento de SpPdp11 y su efecto en la secreción de ECP

Las microalgas se presentan como un ingrediente alternativo en los alimentos acuícolas debido a su composición nutricional, considerándose un sustrato sostenible compatible con el medio ambiente (Nagappan et al., 2021). Igualmente, se ha estudiado el potencial de la microalga *Tisochrysis lutea* (F&M-M36) como sustrato para el crecimiento de *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014, observándose aumentos en la actividad antioxidante de sus ácidos orgánicos con potencial como postbióticos (Pagnini et al., 2023). Por otro lado, García-Márquez et al. (2024) observaron que el uso de varias microalgas como sustratos para el cultivo de un potencial probiótico como *Bacillus pumilus* (cepas UMA 169 y UMA 216), modifica las características postbióticas de los ECP obtenidos. En este sentido, y tras conocer el efecto modulador de los sustratos presentes en el medio de cultivo (**Publicación 3**) sobre el potencial postbiótico de SpPdp11, se planteó el empleo de una mezcla de microalgas (*Chlorella fusca*, *Tisochrysis lutea* y *Microchloropsis gaditana*) y una cianobacteria (*Arthrospira platensis*) en el medio (75 % pienso, 25% mezcla, medio FM; 100% mezcla, medio M) y con incubaciones a 23 °C durante 24 h y a 15 °C durante 48 h (**Publicación 4**).

Se obtuvo un perfil similar de actividades hidrolíticas de compuestos nutricionales y antinutricionales al observado para los ECP de la **Publicación 3**. En general, los ECP obtenidos en medio FM mostraron una mayor actividad hidrolítica que los obtenidos en medio M; sin embargo, los ECP procedentes del medio F (**Publicación 3**) presentaron actividad hidrolítica a concentraciones de proteína menores que el resto de medios empleados. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la inclusión de pienso

experimental en los medios, donde el probiótico debe hidrolizar compuestos complejos para obtener nutrientes. Así, el alto contenido de lípidos, carbohidratos, pigmentos y proteínas asociados a las microalgas (González-González & Bashan, 2021) incorporadas a los medios M y FM, puede ser suficiente para satisfacer los requerimientos nutricionales del probiótico. Esto podría reducir la necesidad de una mayor secreción de metabolitos con actividad hidrolítica. Hoang et al. (2024) demostraron cómo el crecimiento del probiótico *Lactobacillus acidophilus* en un medio suplementado con *Spirulina platensis* mejoró la tasa de supervivencia del probiótico, sobre todo en condiciones adversas de pH o temperatura, aumentando también el contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Ello sugiere un aprovechamiento nutricional por parte del probiótico y una valorización de la microalga como posible aditivo para el cultivo de organismos acuáticos. Por otro lado, la inclusión en la dieta de nanopartículas con ECP derivados de *B. pumilus*, obtenidos de medios con microalgas y cianobacteria aumentó de forma significativa la actividad de enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina y proteasa alcalina total) de secreción pancreática en especímenes de *S. aurata* (García-Márquez et al., 2024). Resultados como estos podrían abrir futuras líneas de investigación relacionadas con la suplementación de las dietas para la alimentación acuícola en el marco de una práctica más sostenible.

Nuevamente, en la **Publicación 4** los resultados muestran que los ECP obtenidos de medio FM y M tampoco presentaron efecto antibacteriano a las concentraciones ensayadas, justificándose la ausencia de esta capacidad de la misma forma que se detalla en la **Publicación 3**. Por otro lado, también se evaluó la capacidad hemolítica y citotóxica de los distintos ECP. Todos los ECP presentaron actividad gamma (γ) hemolítica, lo que parece reforzar el carácter no virulento de estos postbióticos, y por tanto su seguridad (Han et al., 2024; Sori y Khan, 2024). Además, únicamente la condición de ECP M1548 produjo citotoxicidad en las líneas celulares de peces analizadas, mientras que las condiciones FM1548 y M2324 favorecieron la proliferación celular. Estos resultados, al igual que ocurre en la **Publicación 3**, podrían relacionarse con el efecto antioxidante que SpPdp11 ha demostrado ejercer en estudios previos (Vidal et al., 2016; Jurando et al., 2018; Cámara-Ruiz et al., 2020) y más recientes como los trabajos de Chen et al. (2020) y Cerezo et al. (2023) sobre la reparación del tejido y la cicatrización de heridas en la piel en doradas con una dieta suplementada con SpPdp11 vivo. En general, la capacidad antioxidante mitiga el estrés oxidativo y con ello los efectos adversos sobre proliferación

y diferenciación celular, además de otros daños derivados como la pérdida de funcionalidad bioquímica de las células o daños en la permeabilidad de la membrana celular (Pisoschi et al., 2021).

De esta forma, los ECP FM2324, FM1548 y M2324 no presentaron actividad citotóxica en ninguna de las líneas celulares de peces ensayadas, mostrando los dos últimos ECP una importante capacidad para inducir proliferación celular. Además, cada condición presentó un perfil enzimático diferente, con el mayor número de actividades enzimáticas en los ECP obtenidos a partir de FM1548. Por todo ello, se realizó el análisis proteómico de los ECP de las condiciones FM2324, FM1548 y M2324 con objeto de obtener un perfil de las proteínas presentes más representativas.

Del total de proteínas expresadas diferencialmente (DEPs) para cada condición de ECP, algunas están presentes en todas las condiciones, conformando el núcleo o *core* del proteoma. Este núcleo está constituido principalmente por proteínas estructurales y que dirigen los procesos vitales en la célula. El análisis basado en clústeres de genes ortólogos (COG) reveló proteínas comunes, algunas intracelulares, relacionadas con la replicación (DnaC y FtsA), la transcripción (XRE y LysR), la recombinación (XerD) y la demanda de energía y metabolismo celular (CaiB). En este sentido, Stastna et al. (2024) estudiaron el exoproteoma del probiótico *Lactobacillus mucosae* LM1 en presencia de diferentes porcentajes de bilis observando que, bajo estrés biliar, la composición del exoproteoma (tamaño e identidades) variaba. Además, esta bacteria regulaba su exoproteoma mediante la secreción de proteínas intracelulares (ribosómicas, metabólicas y proteínas asociadas a la membrana). SpPdp11 podría estar regulando su secreción de ECP, y con ello su exoproteoma, de la misma forma debido a la presión del medio y adaptación al mismo.

Por otro lado, los distintos ECP analizados contenían proteínas únicas. Los ECP obtenidos de medio FM presentaron proteínas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos (corismato sintasa y treonina desaminasa), que suelen ser proteínas fundamentales en la supervivencia de microorganismos como *Listeria monocytogenes* (Vanajothi et al., 2023) o *Escherichia coli* (Wang et al., 2024). También destacaron proteínas relacionadas con la actividad antioxidante (citocromo C en FM1548 y tiorredoxina en FM2324), esenciales en la reparación celular y el estrés oxidativo (Arnér & Holmgren, 2000), lo que podría estar en concordancia con el efecto antioxidante informado para SpPdp11 (Vidal et al., 2016; Jurado et al., 2018; Cámara-Ruiz et al., 2020) y los ECP analizados en los ensayos

de citotoxicidad con diferentes líneas celulares de peces. Por otro lado, la proteína de secreción PilB ATPasa, presente en algunas especies del género *Shewanella* (Cianciotto y White, 2017) se suele asociar a secreción de proteínas degradativas (Gralnick et al., 2016), pero también se ha relacionado con un sistema flagelar. Los sistemas flagelares dentro de este género son notablemente heterogéneos (Fields et al., 2024), y normalmente se activan como medida de adaptación al ambiente. Por ejemplo, *Shewanella piezotolerans* tiene un comportamiento adaptativo y posee un único flagelo polar en ambientes líquidos, mientras que tiene múltiples flagelos laterales en las superficies (Fields et al., 2024). También se ha observado la activación de genes flagelares laterales por adaptación al frío (Jian et al., 2017). Dado que SpPdp11 presenta flagelo, la proteína PilB ATPase podría estar también asociada a una adaptación al medio, como se ha venido explicando en el presente trabajo.

Por último, los ECP de M2324 presentaron proteínas relacionadas con el proceso de quimiotaxis. Concretamente destacaron la proteína quimiotáctica aceptora de metilo (MCP), el receptor quimiotáctico CheD, la flavin reductasa y la catecol 2,3-dioxigenasa. La quimiotaxis permite a los microorganismos regular su movilidad, evitando ambientes desfavorables y adaptándose a nichos más adecuados (Feng et al., 2021). Según Edelman et al. (2024), la regulación génica de la motilidad ha evolucionado de manera que se optimiza el equilibrio entre la carga metabólica que supone la formación de flagelos y el beneficio de la quimiotaxis en la motilidad, dependiendo de las condiciones ambientales correspondientes. En este sentido, *Shewanella putrefaciens* CN-32 posee un sistema flagelar primario asociado a un sistema quimiotáctico, y un sistema flagelar secundario independiente de la quimiotaxis, y activa así uno u otro en función de la adaptación al medio (Edelman et al., 2024). Igualmente, *E. coli* sigue una estrategia de crecimiento cuando las fuentes de carbono son abundantes, pero cambia a una estrategia de búsqueda quimiotáctica cuando la fuente de carbono es escasa (Colin et al., 2021). De esta forma, SpPdp11 puede estar recurriendo a un mecanismo quimiotáctico para favorecer su supervivencia o adaptación a las condiciones de cultivo a las que se le ha sometido. Es necesario realizar estudios adicionales para esclarecer este posible mecanismo en SpPdp11 y sus ECP, del que no hay información al respecto hasta el momento.

En cualquier caso, el perfil proteómico de las diferentes condiciones de ECP derivados de SpPdp11 muestra la versatilidad del probiótico frente a las condiciones de cultivo, con

capacidad de adaptación a las mismas, especialmente a los diferentes sustratos. En este sentido, queda patente una influencia en la modulación del potencial postbiótico de SpPdp11 cuando se somete a diferentes condiciones de cultivo. Se podría decir que los ECP de SpPdp11 presentan un amplio abanico de posibilidades para ser empleados ya sea en nutrición, frente al estrés o la protección frente a patógenos, que redundaría en un claro beneficio del hospedador y de la acuicultura.

4. Los ECP de SpPdp11 afectan la transcripción del gen codificante de la toxina Aip56 presente en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* Lg 41/01

Uno de los usos emergentes de los postbióticos en la industria acuícola se relaciona con su valor potencial en el control de enfermedades, actuando como antimicrobianos, moduladores de la microbiota intestinal, inmunomoduladores y protectores frente a patógenos (Ang et al., 2020). Un patógeno importante en el sector acuícola es *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*), que afecta a peces de agua salada, invadiendo células no fagocíticas y evadiendo la respuesta inmune a través de una batería de factores de virulencia que incluyen la adquisición de hierro (Nuñez-Díaz et al., 2018), la modulación de la actividad del complemento (Acosta et al., 2006) y de la generación de radicales superóxido del hospedador (Díaz-Rosales et al., 2006) y la producción de la toxina Aip56, que induce apoptosis de las células fagocíticas del hospedador (Freitas et al., 2024).

En el presente trabajo no se ha observado inhibición del crecimiento de *Phdp* Lg 41/01 en presencia de los ECP estudiados; sin embargo, Chabrillón et al. (2005) informaron que las células vivas de SpPdp11 inhibían el crecimiento de *Phdp* Lg 41/01 de forma *in vitro*. Además, en distintos artículos se demostró una cierta protección frente al patógeno por parte de ejemplares de lenguado senegalés alimentados con una dieta suplementada con SpPdp11 (Díaz-Rosales et al., 2009; De la Banda et al., 2010). Esto podría indicar la capacidad del probiótico para modular otros mecanismos antimicrobianos que no fueran el efecto inhibitor del crecimiento del patógeno. En este sentido, se propuso estudiar el posible efecto que los ECP de SpPdp11 pudieran tener sobre la actividad apoptótica de la toxina Aip56 y la expresión del gen que codifica dicha toxina (**Publicación 5**). Para ello se seleccionaron las condiciones de ECP T2348 (**Publicación 3**) y FM1548 (**Publicación**

4), ya que poseían los mejores perfiles de actividades hidrolíticas, no citotóxicas y un efecto antibiofilm y de QQ (Domínguez-Maqueda, 2022).

La toxina Aip56 es una proteína de tipo AB codificada en un plásmido y secretada mediante un sistema de secreción tipo 2 (T2SS) como proteína extracelular (Lisboa et al., 2021; Freitas et al., 2024) que se encuentra presente en los ECP de *Phdp*. La distribución sistémica de esta toxina en los peces infectados está relacionada con la muerte de macrófagos y neutrófilos por necrosis secundaria postapoptótica, lo que genera la liberación de moléculas citotóxicas que contribuyen a las lesiones necróticas características de las infecciones por *Phdp* (Do Vale et al., 2005; Nuñez-Díaz et al., 2018). Los ensayos de mortalidad y apoptosis de los leucocitos de riñón cefálico (HKL) de lubina (*D. labrax*) realizados en este estudio mostraron que los ECP de *Phdp* Lg 41/01 causan en torno a un 60 % de mortalidad y apoptosis con respecto al control, poniendo de manifiesto la acción de la toxina Aip56. Por otro lado, los ECP de SpPdp11 no afectaron a los HKL, contrarrestando los efectos deletéreos sobre dichos linfocitos provocados por los ECP de *Phdp* Lg 41/01. En este sentido, cabe señalar que, previamente, en esta tesis, no se habían observado efectos citotóxicos en los ECP de SpPdp11 frente a diferentes líneas celulares de peces y ello se ha relacionado además con la capacidad de SpPdp11 de favorecer la reparación de tejidos (Chen et al., 2020) y cicatrización de heridas en la piel (Cerezo et al., 2023) de doradas cultivadas. Por lo tanto, el efecto antiapoptótico observado podría tener también relación con el efecto antioxidante de SpPdp11 (Vidal et al., 2016; Jurado et al., 2018; Cámara-Ruiz et al., 2020), evitando de alguna forma el daño celular por la liberación y acción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) propias del estrés oxidativo (Wickramasinghe et al., 2025).

Contrariamente, en los leucocitos incubados con los ECP de SpPdp11 y *Phdp* Lg 41/01 conjuntamente, se incrementó el estallido respiratorio y la capacidad fagocítica en los HKL. Los ECP ensayados afectan a la transcripción de la toxina Aip56, sin embargo, no se conoce el mecanismo exacto de actuación de los ECP a nivel molecular. Los leucocitos fagocíticos suelen aumentar su consumo de oxígeno después de la activación de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) a través de la inducción de NADPH-oxidasa para producir diferentes ROS durante la fagocitosis (Gouife et al., 2023). Jafarzadeh et al. (2024) demostraron cómo la suplementación en la dieta de postbióticos derivados de *Bacillus subtilis* AAHM01 mejoraron la respuesta inmune en lubina asiática (*Lates calcarifer*) aumentando los niveles de inmunoglobulinas, actividad fagocítica,

expresión de citoquinas proinflamatorias y receptores de reconocimiento de patrones en los tejidos inmunes analizados, mejorando la resistencia frente a la infección por *Streptococcus iniae*. En este trabajo se podría sugerir que las condiciones de ECP T2348 y FM1548 podrían mejorar o acelerar la respuesta inmune mediada por células de los HKL durante la infección, posiblemente en respuesta a aquellas toxinas remanentes tras incubación con sobrenadante de *Phdp* Lg 41/01 y los diferentes ECP.

Los ECP de SpPdp11 parecen ejercer un efecto antioxidante y una capacidad inmunorreguladora en los HKL inoculados con sobrenadante de *Phdp* Lg 41/01, capacidades que se podrían asociar a algunas BAL, y postbióticos derivados de las mismas, por su capacidad de detoxificación e inhibición en la producción de toxinas en patógenos (Vieco-Sainz et al., 2019). Por este motivo, los resultados obtenidos con respecto a la apoptosis y el estallido respiratorio por parte de los ECP de SpPdp11 se relacionaron con una posible modulación de la transcripción del gen *aip56*, que se vio reducida significativamente por ambos ECP, T2348 y FM1548. En este sentido, Ozma et al. (2024) demostraron cómo postbióticos derivados de *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium bifidum* inhiben al patógeno *Clostridium difficile* ATCC43255 de diferentes formas: inhibiendo su crecimiento; interfiriendo en la formación de biopelículas y disminuyendo la producción de sus toxinas A y B, reflejada en una disminución significativa de la expresión de los genes *tcdA* y *tcdB* del patógeno. Postbióticos derivados de BAL se emplean en la industria alimentaria para la detoxificación de toxinas fúngicas, como micotoxinas (Hiththathiyage et al., 2025) y aflatoxinas (Khani et al., 2024) tras unirse y secuestrar a las toxinas, eliminándolas o neutralizándolas (Vieco-Sainz et al., 2019). De esta forma, se podría sugerir que los ECP de SpPdp11 podrían estar realizando un efecto de detoxificación o antitoxigénico que mitigaría la virulencia de *Phdp* Lg 41/01, y cuyos mecanismos de actuación sobre la toxina necesitarán estudiarse en más profundidad.

Phdp ha sido objeto de múltiples estrategias de control, entre ellas el uso de antibióticos (Andreoni y Magnani, 2014), vacunas (Andreoni et al., 2013; Guo et al., 2015; Kato et al., 2015), bacteriófagos (Li et al., 2024) o probióticos (Gutiérrez-Falcon et al., 2021; Medina et al., 2023). No obstante, el presente trabajo pretende destacar a los postbióticos como una alternativa interesante en el control de la virulencia asociada a *Phdp*, patógeno para el que aún no se han evaluado los postbióticos como medida de prevención. La presencia de factores de virulencia secretados por los patógenos acuícolas es

relativamente frecuente. Este es el caso de las proteínas damselisina y fobalisina P y la toxina PirAB de *P. damsela* subsp. *damsela* (Barca et al., 2023). Igualmente, el secretoma de *T. maritimum* serotipo O4 y SP91 contiene ECP y vesículas de membrana externa (*Outer Membrane Vesicles*; OMV) que incluyen factores de virulencia como transportadores de sideróforos y proteínas con actividad sialidasa, condroitinasa y esfingomielinasa (Escribano et al., 2023). De esta forma, la ausencia de inhibición del crecimiento del patógeno en presencia de un postbiótico no justificaría descartar su potencial en el control de la virulencia del patógeno, pues puede ejercer un efecto inhibidor sobre los compuestos implicados en la virulencia que son liberados al medio. En función de los resultados obtenidos en el presente trabajo, es interesante plantear la realización de ensayos *in vivo* para conocer el nivel de protección proporcionado por los ECP de SpPdp11 a los peces frente a la infección por *Phdp* en el ambiente acuícola. Además, el potencial antitoxigénico de los ECP derivados de SpPdp11 podría abrir nuevos campos de estudio en la prevención y/o protección frente a otros patógenos, con un papel importante en el biocontrol de enfermedades en acuicultura.

REFERENCIAS

- Abdel-Latif, H. M., Abdel-Tawwab, M., Khalil, R. H., Metwally, A. A., Shakweer, M. S., Ghetas, H. A., & Khallaf, M. A. (2021). Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal in diets of European seabass: Effects on antioxidative capacity, non-specific immunity, transcriptomic responses, and resistance to the challenge with *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 111, 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.01.013>
- Acosta, F., Vivas, J., Padilla, D., Vega, J., Bravo, J., Grasso, V., & Real, F. (2009). Invasion and survival of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in non-phagocytic cells of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Journal of Fish Diseases*, 32(6), 535-541. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01023.x>
- Acosta, M., Quiroz, E., Tovar-Ramírez, D., Roberto, V. P., Dias, J., Gavaia, P. J., & Fernández, I. (2022). Fish microbiome modulation and convenient storage of aquafeeds when supplemented with vitamin K1. *Animals*, 12(23), 3248. <https://doi.org/10.3390/ani12233248>
- Adel, M., Dawood, M.A.O. (2021). Probiotics application: Implications for sustainable aquaculture. In: Mojgani, N., Dadar, M. (eds) Probiotic Bacteria and Postbiotic Metabolites: Role in Animal and Human Health. Microorganisms for Sustainability, vol 2. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0223-8_8
- Aghebati-Maleki, L., Hasannezhad, P., Abbasi, A., & Khani, N. (2021). Antibacterial, antiviral, antioxidant, and anticancer activities of postbiotics: a review of mechanisms and therapeutic perspectives. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(2), 2629-45. <https://doi.org/10.33263/BRIAC122.26292645>
- Al-Shuhaib, M. B. S., & Hashim, H. O. (2023). Mastering DNA chromatogram analysis in Sanger sequencing for reliable clinical analysis. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00587-6>
- Andreoni, F., & Magnani, M. (2014). Photobacteriosis: prevention and diagnosis. *Journal of Immunology Research*, 2014(1), 793817. <https://doi.org/10.1155/2014/793817>
- Ang, C. Y., Sano, M., Dan, S., Leelakriangsak, M., & Lal, T. M. (2020). Postbiotics applications as infectious disease control agent in aquaculture. *Biocontrol Science*, 25(1), 1-7. <https://doi.org/10.4265/bio.25.1>

Arellano, J. M., Storch, V., & Sarasquete, C. (2002). Ultrastructural study on the intestine of Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *Journal of Applied Ichthyology*, 18(3), 154-158. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2002.00332.x>

Balbuena-Alonso, M. G., Cortés-Cortés, G., Kim, J. W., Lozano-Zarain, P., Camps, M., & del Carmen Rocha-Gracia, R. (2022). Genomic analysis of plasmid content in food isolates of *E. coli* strongly supports its role as a reservoir for the horizontal transfer of virulence and antibiotic resistance genes. *Plasmid*, 123, 102650. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2022.102650>

Bandín, I., & Souto, S. (2020). Betanodavirus and VER disease: a 30-year research review. *Pathogens*, 9(2), 106. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020106>

Barca, A. V., Vences, A., Terceti, M. S., do Vale, A., & Osorio, C. R. (2023). Low salinity activates a virulence program in the generalist marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Msystems*, 8(3), e01253-22. <https://doi.org/10.1128/msystems.01253-22>

Bhimani, A.A., Bhimani, H.D., Vaghela, N.R., & Goel, S. D. (2024). Cultivation methods, characterization, and biocatalytic potential of organic solid waste degrading bacteria isolated from sugarcane rhizospheric soil and compost. *Biologia*, 79, 953–974. <https://doi.org/10.1007/s11756-023-01592-3>

Brealey, J. C., Kodama, M., Rasmussen, J. A., Hansen, S. B., Santos-Bay, L., Lecaudey, L. A., Hansen, M., Fjaere, E., Myrmel, L. S., Madsen, L., Bernhard, A., Sveier, H., Kristiansen, K., Gilbert, M. T. P., Marin, M. D., & Limborg, M. T. (2024). Host–gut microbiota interactions shape parasite infections in farmed Atlantic salmon. *Msystems*, 9(2), e01043-23. <https://doi.org/10.1128/msystems.01043-23>

Breitenbach, R., Gerrits, R., Dementyeva, P., Knabe, N., Schumacher, J., Feldmann, I., Radnik, J., Ryo, M., & Gorbushina, A. A. (2022). The role of extracellular polymeric substances of fungal biofilms in mineral attachment and weathering. *npj Materials Degradation*, 6(1), 42. <https://doi.org/10.1038/s41529-022-00253-1>

Bukowski, M., Piwowarczyk, R., Madry, A., Zagorski-Przybyło, R., Hydzik, M., & Władyka, B. (2019). Prevalence of antibiotic and heavy metal resistance determinants and virulence-related genetic elements in plasmids of *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 805. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00805>

Cámara-Ruiz, M., Balebona, M. C., Moriñigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2020). Probiotic *Shewanella putrefaciens* (SpPdp11) as a fish health modulator: a review. *Microorganisms*, 8(12), 1990. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121990>

Cerezo, I. M., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S. T., Bautista, R., Anguís, V., Fernández-Díaz, C., Alarcón, F. J., Moriñigo, M.A., & Balebona, M. C. (2022). *Solea senegalensis* bacterial intestinal microbiota is affected by low dietary inclusion of *Ulva ohnoi*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 801744. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.801744>

Cerezo, I. M., Pérez-Gómez, O., Bautista, R., Seoane, P., Esteban, M. Á., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., & Tapia-Paniagua, S. T. (2023). SpPdp11 administration in diet modified the transcriptomic response and its microbiota associated in mechanically induced wound *Sparus aurata* skin. *Animals*, 13(2), 193. <https://doi.org/10.3390/ani13020193>

Cerezo Ortega, I. M. (2024). Influencia de dietas funcionales con algas y probióticos en las mucosas de peces de interés acuícola. [Tesis doctoral, Universidad de Málaga]. RIUMA. <https://hdl.handle.net/10630/35787>.

Chabrillón, M., Rico, R.M., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A. (2005b). Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, 28, 229–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00623.x>

Che, J., Shi, J., Fang, C., Zeng, X., Wu, Z., Du, Q., Tu, M., & Pan, D. (2024). Elimination of pathogen biofilms via postbiotics from lactic acid bacteria: A promising method in food and biomedicine. *Microorganisms*, 12(4), 704. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040704>

Chen, Z., Ceballos-Francisco, D., Guardiola, F. A., & Esteban, M. Á. (2020). Dietary administration of the probiotic *Shewanella putrefaciens* to experimentally wounded gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) facilitates the skin wound healing. *Scientific Reports*, 10(1), 11029. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68024-z>

Chong, R. S. M. (2022). Antinutritional factors in plant-based feeds. In *Aquaculture pathophysiology* (pp. 659-668). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812211-2.00055-X>

Chouayekh, H., Farhat-Khemakhem, A., Karray, F., Boubaker, I., Mhiri, N., Abdallah, M. B., Alghamdi, O. A., & Guerbej, H. (2023). Effects of dietary supplementation with *Bacillus amyloliquefaciens* US573 on intestinal morphology and gut microbiota of European sea bass. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 15(1), 30-43. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09974-w>

Choudhury, T. G., & Kamilya, D. (2019). Paraprobiotics: An aquaculture perspective. *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 1258-1270. <https://doi.org/10.1111/raq.12290>

Cianciotto, N. P., & White, R. C. (2017). Expanding role of type II secretion in bacterial pathogenesis and beyond. *Infection and Immunity*, 85(5), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/iai.00014-17>

Colin, R., Ni, B., Laganenka, L., & Sourjik, V. (2021). Multiple functions of flagellar motility and chemotaxis in bacterial physiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(6), fuab038. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab038>

de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2060-2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>

De Silva, L. A. D. S., & Heo, G. J. (2023). Biofilm formation of pathogenic bacteria isolated from aquatic animals. *Archives of Microbiology*, 205(1), 36. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03332-8>

De Vallée, A., Dupuy, J. W., Moriscot, C., Gallet, B., Vanderperre, S., Guignard, G., Rascle, C., Calvar, G., Malbert, B., Gillet, F. X., Dieryckx, C., Choquer, M., Girard, V., Poussereau, N., & Bruel, C. (2023). Extracellular vesicles of the plant pathogen *Botrytis cinerea*. *Journal of Fungi*, 9(4), 495. <https://doi.org/10.3390/jof9040495>

Derakhshesh, N., Movahedinia, A., Salamat, N., Hashemitabar, M., & Bayati, V. (2017). Using a liver cell culture from *Epinephelus coioides* as a model to evaluate the nonylphenol-induced oxidative stress. *Marine Pollution Bulletin*, 122(1-2), 243-252. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.049>

Di Nunzio, M., Valli, V., Tomás-Cobos, L., Tomás-Chisbert, T., Murgui-Bosch, L., Danesi, F., & Bordoni, A. (2017). Is cytotoxicity a determinant of the different *in vitro*

and *in vivo* effects of bioactives? *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1962-2>

Díaz-Rosales, P., Chabrillón, M., Arijó, S., Martínez-Manzanares, E., Moriñigo, M. A., & Balebona, M. C. (2006). Superoxide dismutase and catalase activities in *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, 29(6), 355-364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00726.x>

do Vale, A., Silva, M. T., dos Santos, N. M., Nascimento, D. S., Reis-Rodrigues, P., Costa-Ramos, C., Ellis, A. E., & Azevedo, J. E. (2005). AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Molecular Microbiology*, 58(4), 1025-1038. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04893.x>

Domingo-Bretón, R., Cools, S., Moroni, F., Belenguer, Á., Caldach-Giner, J. À., Croes, E., Holhorea, P. G., Català, F. N., Boon, H., & Pérez-Sánchez, J. (2024). Intestinal microbiota shifts as a marker of thermal stress during extreme heat summer episodes in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). 22 August 2024, PREPRINT (Version 1) Disponible en Research Square: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4809319/v1>

Domínguez-Maqueda, M., Cerezo, I. M., Tapia-Paniagua, S. T., De La Banda, I. G., Moreno-Ventas, X., Moriñigo, M. Á., & Balebona, M. C. (2021). A tentative study of the effects of heat-inactivation of the probiotic strain *Shewanella putrefaciens* pdp11 on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) intestinal microbiota and immune response. *Microorganisms*, 9(4), 808. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040808>

Domínguez-Maqueda, M. (2022, 27-30 de septiembre). The probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 target virulence factors by modulating quorum-sensing inhibition. [Póster de Congreso]. Aquaculture Europe 2022, Rimini, Italia. [RIUMA. https://hdl.handle.net/10630/25181](https://hdl.handle.net/10630/25181)

Edelmann, D. B., Jakob, A. M., Wilson, L. G., Colin, R., Brandt, D., Eck, F., Kalinowski, J., & Thormann, K. M. (2024). Role of a single MCP in evolutionary adaptation of *Shewanella putrefaciens* for swimming in planktonic and structured environments. *bioRxiv*, 2024-10. <https://doi.org/10.1101/2024.10.15.618407>

Elbahnaswy, S., Elshopakey, G. E., Abdelwarith, A. A., Younis, E. M., Davies, S. J., & El-Son, M. A. (2024). Immune protective, stress indicators, antioxidant, histopathological

status, and heat shock protein gene expression impacts of dietary *Bacillus* spp. against heat shock in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *BMC Veterinary Research*, 20(1), 469. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04303-5>

Elham, N., Naheed, M., Elahe, M., Hossein, M. M., & Majid, T. (2022). Selective cytotoxic effect of probiotic, paraprobiotic and postbiotics of *L. casei* strains against colorectal cancer cells: *in vitro* studies. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58, e19400. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e19400>

Elmnasser, N., Hassen, W., Zmantar, T., Ashraf, S. A., Lajimi, R. H., Humaidi, J. R., Alreshidi, M., Hamadou, W. S., Emira, N., & Snoussi, M. (2024). Antagonistic and enzymatic activities of *Bacillus* species isolated from the fish gastrointestinal tract as potential probiotics use in Artemia culture. *Cellular and Molecular Biology*, 70(5), 48-58. <https://doi.org/10.14715/cmb/2024.70.5.8>

Escribano, M. P., Balado, M., Toranzo, A. E., Lemos, M. L., & Magariños, B. (2023). The secretome of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* includes soluble virulence-related proteins and outer membrane vesicles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1197290. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1197290>

Feng, H., Fu, R., Hou, X., Lv, Y., Zhang, N., Liu, Y., Xu, Z., Miao, Y., Krell, T., Shen, Q., & Zhang, R. (2021). Chemotaxis of beneficial rhizobacteria to root exudates: the first step towards root-microbe rhizosphere interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6655. <https://doi.org/10.3390/ijms22136655>

Fields, J. L., Zhang, H., Bellis, N. F., Petersen, H. A., Halder, S. K., Rich-New, S. T., Krupovic, M., Wu, H., & Wang, F. (2024). Structural diversity and clustering of bacterial flagellar outer domains. *Nature Communications*, 15(1), 9500. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53923-w>

Freitas, I. L., Teixeira, A., Loureiro, I., Lisboa, J., Saraiva, A., Dos Santos, N. M. S., & do Vale, A. (2022). Susceptibility of sea bream (*Sparus aurata*) to AIP56, an AB-Type toxin secreted by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Toxins*, 14(2), 119. <https://doi.org/10.3390/toxins14020119>

Frimodt-Møller, J., Boesen, T. O., Charbon, G., & Løbner-Olesen, A. (2024). Bacterial chromosomes and their replication. *Molecular Medical Microbiology*, 279-307. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818619-0.00007-1>

García-Márquez, J., Díaz, A. G., Molina-Roque, L., Domínguez-Maqueda, M., De las Heras, V., Simó-Mirabet, P., Vizcaíno, A. J., Martos-Sitcha, J. A., Alarcón-López, F. J., Moriñigo, M. A., & Balebona, M. C. (2024). Microalgal and cyanobacterial biomasses modified the activity of extracellular products from *Bacillus pumilus*: An *in vitro* and *in vivo* assessment. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10350-z>

Garnier, L., Mounier, J., Lê, S., Pawtowski, A., Pinon, N., Camier, B., Chatel, M., Garric, G., Thierry, A., Coton, E., & Valence, F. (2019). Development of antifungal ingredients for dairy products: From *in vitro* screening to pilot scale application. *Food Microbiology*, 81, 97-107. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.003>

Gökmen, G. G., Sarıyıldız, S., Cholakov, R., Nalbantsoy, A., Baler, B., Aslan, E., Düzel, A., Sargin, S., Göksungur, Y., & Kışla, D. (2024). A novel *Lactiplantibacillus plantarum* strain: probiotic properties and optimization of the growth conditions by response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(2), 66. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03862-3>

Gonçalves, M., Lopes, C., & Silva, P. (2024). Comparative histological description of the intestine in platyfish (*Xiphophorus maculatus*) and swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Tissue and Cell*, 87, 102306. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2024.102306>

González-González, L. M., & De-Bashan, L. E. (2021). Toward the enhancement of microalgal metabolite production through microalgae–bacteria consortia. *Biology*, 10(4), 282. <https://doi.org/10.3390/biology10040282>

Gopalraaj, J., Velayudhannair, K., Arockiasamy, J. P., & Radhakrishnan, D. K. (2024). The effect of dietary supplementation of proteases on growth, digestive enzymes, oxidative stress, and intestinal morphology in fishes—A review. *Aquaculture International*, 32(1), 745-765. <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01191-8>

Gouife M, Zhu S, Yue X, Nawaz M, Li X, Ma R, Jiang J, Jin S, Xie J (2023) Characterization of the pro-inflammatory roles of the goldfish (*Carassius auratus* L.) M17 protein. *Developmental & Comparative Immunology*, 145, 104714. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2023.104714>

Gralnick, J. A., Vali, H., Lies, D. P., & Newman, D. K. (2006). Extracellular respiration of dimethyl sulfoxide by *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12), 4669-4674. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505959103>

Guo, J. J., Huang, M. Y., Hong, J. W., Chuang, Y. C., Chou, R. L., Lee, Y. H., & Chen, T. I. (2015). The efficacy of inactivated *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* combined with levan/alum as vaccine against photobacteriosis in Cobia, *Rachycentron canadum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 46(5), 549-556. <https://doi.org/10.1111/jwas.12216>

Gutierrez Falcon, A., Padilla, D., Real, F., Ramos Sosa, M. J., Acosta-Hernández, B., Sanchez Henao, A., García-Álvarez, N., Rosario Medina, I., Silva Sergeant, F., Dèniz, S., & Martín-Barrasa, J. L. (2021). Screening of new potential probiotics strains against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* for marine aquaculture. *Animals*, 11(7), 2029. <https://doi.org/10.3390/ani11072029>

Han, K. I., Shin, H. D., Lee, Y., Baek, S., Moon, E., Park, Y. B., Cho, J., Lee, J. H., Kim, T. J., & Manoharan, R. K. (2024). Probiotic and postbiotic potentials of *Enterococcus faecalis* EF-2001: A Safety Assessment. *Pharmaceuticals*, 17(10), 1383. <https://doi.org/10.3390/ph17101383>

Han, Z., Sun, J., Liu, X., Sun, X., Shi, H., & Guo, Y. (2021). The delimitation of intestine segments of koi carp (*Cyprinus carpio* var. koi) based on histological features. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 50(5), 763-769. <https://doi.org/10.1111/ahe.12722>

He, L., Zhao, C., Xiao, Q., Zhao, J., Liu, H., Jiang, J., & Cao, Q. (2023). Profiling the Physiological Roles in Fish Primary Cell Culture. *Biology*, 12(12), 1454. <https://doi.org/10.3390/biology12121454>

Hiththathiyage, R., Wickramasinghe, M., Rathnayaka, I., Dias, C., Rambodagedara, S., Jayawardana, B., & Liyanage, R. (2025). Biodegradation of mycotoxins using postbiotics. In *Postbiotics* (pp. 681-701). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-22188-0.00040-1>

Hoang, P. H., Nguyen, M. T., Ngo, H. T. T., Chu, N. H., Ha, P. T., Bui, H. G., & To, L. H. (2024). Enhancement of bioactive compounds and survival of *Lactobacillus acidophilus* grown in the omega-6,-7 riched cyanobacteria *Spirulina platensis*. *Current Microbiology*, 81(11), 380. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03865-9>

Jafarzadeh, F., Roomiani, L., Dezfoulnejad, M. C., Baboli, M. J., & Sary, A. A. (2024). Harnessing paraprobiotics and postbiotics for enhanced immune function in Asian seabass (*Lates calcarifer*): Insights into pattern recognition receptor signaling. *Fish & Shellfish Immunology*, 151, 109725. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109725>

Jaffar, N., Ishikawa, Y., Mizuno, K., Okinaga, T., & Maeda, T. (2016). Mature biofilm degradation by potential probiotics: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* versus *Lactobacillus* spp. *PLoS One*, 11(7), e0159466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159466>

Jalali, S., Mojgani, N., Haghighat, S., Sanjabi, M. R., & Sarem-Nezhad, S. (2024). Investigation of antimicrobial and antioxidant properties of postbiotics produced by *Lactocaseibacillus rhamnosus* and *Limosilactobacillus reuteri* and their potential application in surface decontamination of red meat. *LWT*, 209, 116758. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116758>

Jawan, R., Abbasiliasi, S., Mustafa, S., Kapri, M. R., Halim, M., & Ariff, A. B. (2021). In vitro evaluation of potential probiotic strain *Lactococcus lactis* Gh1 and its bacteriocin-like inhibitory substances for potential use in the food industry. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13, 422-440. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09690-3>

Jian, H., Xu, G., Wang, F., & Xiao, X. (2017). Characterisation of the regulatory function of the H-NS protein in the benthic bacterium *Shewanella piezotolerans* WP3 under cold conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 364(4), fnx021. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx021>

Kalinichenko, S., Melentyeva, K., Manee, H., Dubinina, N., Zvereva, N., Toryanik, I., Popova, N. G., & Pakhomov, O. (2020). Study of anti-virus actions of metabolites of *Lactobacteria*. *Wiadomości Lekarskie*, 73:1484–1488. <https://doi.org/10.36740/WLek202007132>

Kato, G., Yamashita, K., Kondo, H., & Hirono, I. (2015). Protective efficacy and immune responses induced by a DNA vaccine encoding codon-optimized PPA1 against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in Japanese flounder. *Vaccine*, 33(8), 1040-1045. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.011>

Khakpour, M., Mohsenzadeh, M. & Salari, A. (2024). Feasibility of *Lactiplantibacillus plantarum* postbiotics production in challenging media by different techniques. *AMB Express*, 14, 47. <https://doi.org/10.1186/s13568-024-01704-5>

Khani, N., Abedi Soleimani, R., Chadorshabi, S., Moutab, B. P., Milani, P. G., & Rad, A. H. (2024). Postbiotics as candidates in biofilm inhibition in food industries. *Letters in Applied Microbiology*, 77(4), ovad069. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovad069>

Khani, N., Noorkhajavi, G., Soleiman, R. A., Raziabad, R. H., Rad, A. H., & Akhlaghi, A. P. (2024). Aflatoxin biodetoxification strategies based on postbiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10242-2>

Lerner, A., Benzvi, C., & Vojdani, A. (2024). The potential harmful effects of Genetically Engineered Microorganisms (GEMs) on the intestinal microbiome and public health. *Microorganisms*, 12(2), 238. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020238>

Li, S., Tran, N.T. (2022). Paraprobiotics in Aquaculture. In: Austin, B., Sharifuzzaman, S. (eds) *Probiotics in Aquaculture*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-98621-6_7

Li, X., Yuan, L., Huang, K., Chen, S., Zhou, S., Ma, R., Jiang, J., & Xie, J. (2024). Isolation and characterization of a bacteriophage for biological control of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in silver pomfret mariculture. *Aquaculture*, 582, 740539. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740539>

Lisboa, J., Pereira, C., Rifflet, A., Ayala, J., Terceti, M. S., Barca, A. V., Rodrigues, I., Barbosa-Pereira, P. J., Osorio, C. R., García-del Portillo, F., Boneca, I. G., do Vale, A., & Dos Santos, N. M. (2021). A secreted NlpC/P60 endopeptidase from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* cleaves the peptidoglycan of potentially competing bacteria. *Mosphere*, 6(1), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/msphere.00736-20>

Liu, P.V. (1957). Survey of hemolysin production among species of *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology*, 74(6), 718–727. <https://doi.org/10.1128/jb.74.6.718-727>

Liu, Y., Ding, X., Brown, P. B., Bai, Y., Liu, Z., Shen, J., Liu, H., & Huang, Y. (2023). The digestive enzyme activity, intestinal microbiota and immune-related genes expression of snakehead fish (*Channa argus*) juveniles affected by dietary cricket (*Gryllus testaceus*) meal. *Animal Feed Science and Technology*, 304, 115721. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115721>

Lv, X., Cui, T., Du, H., Sun, M., Bai, F., Li, J., & Zhang, D. (2021). *Lactobacillus plantarum* CY 1-1: A novel quorum-quenching bacteria and anti-biofilm agent against *Aeromonas sobria*. *LWT*, 137, 110439. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110439>

Ma, N., Sun, J., Li, S., Shao, M., Ying, N., Liu, W., & Zhu, L. (2023). A potential risk comprehensive evaluation model of probiotic species based on complete genome sequences. *Food Analytical Methods*, 16(5), 961-973. <https://doi.org/10.1007/s12161-023-02456-x>

MacLean, R. C., & San Millan, A. (2019). The evolution of antibiotic resistance. *Science*, 365(6458), 1082-1083. <https://doi.org/10.1126/science.aax3879>

Mani-López, E., Arriola-Bretón, D., & López-Malo, A. (2022). The impacts of antimicrobial and antifungal activity of cell-free supernatants from lactic acid bacteria *in vitro* and foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(1), 604-641. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12872>

Marijani, E., Kigadye, E., & Okoth, S. (2019). Occurrence of fungi and mycotoxins in fish feeds and their impact on fish health. *International Journal of Microbiology*, 2019(1), 6743065. <https://doi.org/10.1155/2019/6743065>

Medina, A., García-Márquez, J., Moriñigo, M. Á., & Arijo, S. (2023). Effect of the potential probiotic *Vibrio proteolyticus* DCF12. 2 on the immune system of *Solea senegalensis* and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Vibrio harveyi*. *Fishes*, 8(7), 344. <https://doi.org/10.3390/fishes8070344>

Moradi, M., Molaei, R., & Guimarães, J.T. (2021). A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 143:109722. <https://doi.org/10.1016/j.enzmtec.2020.109722>

Moreno, P., Álvarez-Torres, D., Balebona, M. C., Domínguez-Maqueda, M., Moriñigo, M. Á., Béjar, J., Alonso, M. C., & García-Rosado, E. (2023). Inhibition of nervous necrosis virus replication by *Shewanella putrefaciens* Pdp11 extract. *Aquaculture*, 575, 739812. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739812>

Mudaliar, S. B., Poojary, S. S., Bharath Prasad, A. S., & Mazumder, N. (2024). Probiotics and paraprobiotics: Effects on Microbiota-Gut-Brain axis and their consequent potential in neuropsychiatric therapy. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 16, 1440–1464. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10214-6>

Murali, S. K., & Mansell, T. J. (2024). Next generation probiotics: Engineering live biotherapeutics. *Biotechnology Advances*, 108336. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108336>

Nagappan, S., Das, P., AbdulQuadir, M., Thafer, M., Khan, S., Mahata, C., Al-Jabri, H., Vatland, A. K., & Kumar, G. (2021). Potential of microalgae as a sustainable feed ingredient for aquaculture. *Journal of Biotechnology*, 341, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.09.003>

Nasaj, M., Chehelgerdi, M., Asghari, B., Ahmadih-Yazdi, A., Asgari, M., Kabiri-Samani, S., Sharifi, E., & Arabestani, M. (2024). Factors influencing the antimicrobial mechanism of chitosan action and its derivatives: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134321. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134321>

Nasri, F., Alizadeh, A., İncili, G. K., Hayaloğlu, A. A., & Moradi, M. (2024). Investigating chemical composition and functionality of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 postbiotics prepared in classic and cheese whey media. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10435-9>

Neissi, A., Heidarieh, M., Shahhosseini, G., Zahed, H. M., & Kalantari-Hesari, A. (2024). Improvement of the immunological and antioxidant capacity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by using the paraprobiotic *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*. *Aquaculture Reports*, 38, 102304. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102304>

Núñez-Díaz, J. A., Fumanal, M., Do Vale, A., Fernández-Díaz, C., Moriñigo, M. Á., & Balebona, M. C. (2018). Transcription of IVIAT and virulence genes in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* infecting *Solea senegalensis*. *Microorganisms*, 6(3), 67. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030067>

Oliveira, M., & Vasconcelos, V. (2020). Occurrence of mycotoxins in fish feed and its effects: A review. *Toxins*, 12(3), 160. <https://doi.org/10.3390/toxins12030160>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2023. Estadísticas de pesca y acuicultura. Producción acuícola mundial 1950 – 2021 (FishstatJ). Roma, Italia. Obtenido de: www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en (Último acceso: 12/02/2025).

Ozma, M. A., Hosseini, H. M., Ataee, M. H., & Mirhosseini, S. A. (2024). Evaluating the antibacterial, antibiofilm, and anti-toxigenic effects of postbiotics from lactic acid

bacteria on *Clostridium difficile*. *Iranian Journal of Microbiology*, 16(4), 497. <https://doi.org/10.18502/ijm.v16i4.16309>

Pagnini, C., Sampietro, G., Santini, G., Biondi, N., & Rodolfi, L. (2023). *Tisochrysis lutea* as a substrate for lactic acid fermentation: Biochemical composition, digestibility, and functional properties. *Foods*, 12(6), 1128. <https://doi.org/10.3390/foods12061128>

Peng, X., Ed-Dra, A., & Yue, M. (2022). Whole genome sequencing for the risk assessment of probiotic lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(32), 11244–11262. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2087174>

Pereira, R. T., Nebo, C., de Paula Naves, L., Fortes-Silva, R., Regina Cardoso de Oliveira, I., Paulino, R. R., Drummond, C. D., & Rosa, P. V. (2020). Distribution of goblet and endocrine cells in the intestine: A comparative study in Amazonian freshwater Tambaqui and hybrid catfish. *Journal of Morphology*, 281(1), 55-67. <https://doi.org/10.1002/jmor.21079>

Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., & Serban, A. I. (2021). Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209, 112891. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>

Povea-Cabello, S., Brischigliaro, M., & Fernández-Vizarra, E. (2024). Emerging mechanisms in the redox regulation of mitochondrial cytochrome c oxidase assembly and function. *Biochemical Society Transactions*, 52(2), 873-885. <https://doi.org/10.1042/BST20231183>

Puvača, N., Kostić, B., Pelić, M., & Ljubojević Pelić, D. (2024). Mycotoxins in fish production and impact on fish health. Disponible en: <https://repo.niv.ns.ac.rs/xmlui/handle/123456789/865>

Quintanilla-Pineda, M., Díaz, J., Gutiérrez-Falcon, A., Ibañez, F. C., & Marzo, F. (2023). Profiling a new postbiotic product for its application in fish aquaculture. *Fishes*, 8(6), 304. <https://doi.org/10.3390/fishes8060304>

Radovanovic, M., Kekic, D., Gajic, I., Kabic, J., Jovicevic, M., Kekic, N., Opavski, N., & Ranin, L. (2023). Potential influence of antimicrobial resistance gene content in probiotic bacteria on the gut resistome ecosystems. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1054555. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1054555>

Rafique, N., Jan, S. Y., Dar, A. H., Dash, K. K., Sarkar, A., Shams, R., Pandey, V. K., Khan, S. A., Amin, Q. A., & Hussain, S. Z. (2023). Promising bioactivities of postbiotics: A comprehensive review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 100708. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100708>

Rasmussen, Jacob A., Kiilerich, P., Madhun, A. S., Waagbø, R., Lock, E. J. R., Madsen, L., Gilbert, M. T. P., Kristiansen, K., & Limborg, M. T. (2023). Co-diversification of an intestinal Mycoplasma and its salmonid host. *ISME Journal*, 17(5), 682–692. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01379-z>

Ray, A. K., Ghosh, K., & Ringø, E. J. A. N. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*, 18(5), 465-492. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x>

Rocha, S. D. C., Lei, P., Morales-Lange, B., Mydland, L. T., & Øverland, M. (2023). From a cell model to a fish trial: Immunomodulatory effects of heat-killed *Lactiplantibacillus plantarum* as a functional ingredient in aquafeeds for salmonids. *Frontiers in Immunology*, 14, 1125702. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1125702>

Ruiz, A., Andree, K. B., Furones, D., Holhorea, P. G., Calduch-Giner, J. À., Viñas, M., Pérez-Sánchez, J., & Gisbert, E. (2023). Modulation of gut microbiota and intestinal immune response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) by dietary bile salt supplementation. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1123716. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1123716>

Saarela, M. H. (2019). Safety aspects of next generation probiotics. *Current Opinion in Food Science*, 30, 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.09.001>

Sandbakken, I. S., Su, H., Johansen, L., Zhang, Y., Ringø, E., Røsbak, R., Yakovlev, I., Five, K. K., & Olsen, R. E. (2024). Replacing fishmeal with salmon hydrolysate reduces the expression of intestinal inflammatory markers and modulates the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Frontiers in Marine Science*, 11, 1376516. <https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1376516>

Santana, G. B., Quelemes, P. V., da Silva Neta, E. R., de Lima, S. G., & Vale, G. C. (2024). Chemical characterization and effect of a lactobacilli-postbiotic on *Streptococcus mutans* biofilm *in vitro*. *Microorganisms*, 12(5), 843. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050843>

Shawky, A., Abd El-Razek, I. M., El-Halawany, R. S., Zaineldin, A. I., Amer, A. A., Gewaily, M. S., & Dawood, M. A. (2023). Dietary effect of heat-inactivated *Bacillus subtilis* on the growth performance, blood biochemistry, immunity, and antioxidative response of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Aquaculture*, 575, 739751. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739751>

Singh, A., Vidakovic, A., Hjertner, B., Krikigianni, E., Karnaouri, A., Christakopoulos, P., Rova, U., Dicksved, J., Baruah, K., & Lundh, T. (2024). Effects of dietary supplementation of lignocellulose-derived cello-oligosaccharides on growth performance, antioxidant capacity, immune response, and intestinal microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 578, 740002. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740002>

Soltan, N. M., Soaudy, M. R., Abdella, M. M., & Hassaan, M. S. (2023). Partial dietary fishmeal replacement with mixture of plant protein sources supplemented with exogenous enzymes modify growth performance, digestibility, intestinal morphology, haemato-biochemical and immune responses for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Animal Feed Science and Technology*, 299, 115642. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115642>

Sori, N., & Khan, M. (2024). Gamma Amino Butyric Acid (GABA) and Ferulic Acid Esterase (FAE) producing psychobiotic bacteria isolated from cereal-based fermented food. *Current Microbiology*, 81(2), 59. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03580-x>

Stastna, M. (2024). The role of proteomics in identification of key proteins of bacterial cells with focus on probiotic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(16), 8564. <https://doi.org/10.3390/ijms25168564>

Stosik, M., Tokarz-Deptuła, B., & Deptuła, W. (2023). Immunity of the intestinal mucosa in teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 133, 108572. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108572>

Tang, X., Shang, J., Ji, Y., & Sun, Y. (2023). PLASMe: a tool to identify PLASMid contigs from short-read assemblies using transformer. *Nucleic Acids Research*, 51(15), e83-e83. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad578>

Tao, L. T., Lu, H., Xiong, J., Zhang, L., Sun, W. W., & Shan, X. F. (2024). The application and potential of postbiotics as sustainable feed additives in aquaculture. *Aquaculture*, 741237. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741237>

Tapia-Paniagua, S. T., Fumanal, M., Anguís, V., Fernández-Díaz, C., Alarcón, F. J., Moriñigo, M. A., & Balebona, M. C. (2019). Modulation of intestinal microbiota in *Solea senegalensis* fed low dietary level of *Ulva ohnoi*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 171. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00171>

Thorakkattu, P., Khanashyam, A. C., Shah, K., Babu, K. S., Mundanat, A. S., Deliephan, A., Deokar, G. S., Santivarangkna, C., & Nirmal, N. P. (2022). Postbiotics: current trends in food and pharmaceutical industry. *Foods*, 11(19), 3094. <https://doi.org/10.3390/foods11193094>

Tian, R., Zhou, J., & Imanian, B. (2024). PlasmidHunter: Accurate and fast prediction of plasmid sequences using gene content profile and machine learning. *Briefings in Bioinformatics*, 25(4), bbae322. <https://doi.org/10.1093/bib/bbae322>

Tomé, A. R., Carvalho, F. M., Teixeira-Santos, R., Burmølle, M., Mergulhão, F. J., & Gomes, L. C. (2023). Use of probiotics to control biofilm formation in food industries. *Antibiotics*, 12(4), 754. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040754>

Uelze, L., Grützke, J., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Juraschek, K., Deneke, C., Tausch, S. H., & Malorny, B. (2020). Typing methods based on whole genome sequencing data. *One Health Outlook*, 2, 1-19. <https://doi.org/10.1186/s42522-020-0010-1>

Valiullin, L. R., Mukhammadiev, R. S., Gumerov, V. G., Sadykov, B. A., Mukhammadiev, R. S., Sorokina, D. A., Tarasova, E. Y., & Mukhammadieva, A. S. (2024). Formation of the bacterial community as the basis of probiotic supplement for livestock. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 105, p. 04001). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/bioconf/202410504001>

Vanajothi, R., Bhavaniramya, S., Vijayakumar, R., Alothaim, A. S., Alqurashi, Y. E., Vishnupriya, S., Vaseeharan, B., & Umadevi, M. (2023). *In silico* and *in vitro* analysis of *Nigella sativa* bioactives against chorismate synthase of *Listeria monocytogenes*: A target protein for biofilm inhibition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(1), 519-533. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04157-3>

Verdile, N., Pasquariello, R., Scolari, M., Scirè, G., Brevini, T. A., & Gandolfi, F. (2020). A detailed study of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) intestine revealed that digestive and absorptive functions are not linearly distributed along its length. *Animals*, 10(4), 745. <https://doi.org/10.3390/ani10040745>

Vienco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., & Drider, D. (2019). Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in Microbiology*, 10, 57. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>

Villamil, L. A., Tafalla, C., Figueras, A., & Novoa, B. (2002). Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Clinical and Vaccine Immunology*, 9(6), 1318-1323. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.6.1318-1323.2002>

Vivas, M. C., & Gutierrez, A. D. C. M. (2019). Typification methods and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* with methicillin resistance. *Staphylococcus Aureus*, 13. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76442>

Wang, G., Wang, Q., Qi, Q., & Wang, Q. (2024). Dynamic plasmid copy number control for synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 42(2), 147-150. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.08.004>

Wang, H., Yuan, H., Zhang, J., & Yan, W. (2024). Targeting threonine deaminase with chiral Au NPs: A novel strategy for *E. coli* inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 737, 150924. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.150924>

Wang, L., Zhu, L., & Qin, S. (2019). Gut microbiota modulation on intestinal mucosal adaptive immunity. *Journal of Immunology Research*, 2019(1), 4735040. <https://doi.org/10.1155/2019/4735040>

Wang, W., Feng, Y., Tarique, I., Liu, J., Chen, S., Wang, Y., Zhu, Z., Meng, X., Peng, L., & Yang, P. (2023). Cellular evidence of mucus cell immunological and differentiation characteristics in allogeneic crucian carp intestinal lamina propria. *Fish & Shellfish Immunology*, 141, 109024. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.109024>

Wu, J., Zhang, Y., Ye, L., & Wang, C. (2021). The anti-cancer effects and mechanisms of lactic acid bacteria exopolysaccharides *in vitro*: A review. *Carbohydrate Polymers*, 253, 117308. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117308>

Wu, Y. C., Chu, L. S., Cheng, C. H., & Chi, S. C. (2020). The presence of substances of the *Shewanella* strain 0409, isolated from grouper intestine, gives antiviral activity against *Betanodavirus* in cell cultures and protection of fish. *Aquaculture*, 518, 734862. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734862>

Wu, Y. C., Tsai, C. H., & Chi, S. C. (2021). Ammonium produced from *Shewanella* strain 0409 contributes to antiviral activity against *Betanodavirus*. *Aquaculture*, 533, 736131. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736131>

Xu, W., Lutz, C. G., Taylor, C. M., & Ortega, M. C. (2022). Improvement of fish growth and metabolism by oligosaccharide prebiotic supplement. *Aquaculture Nutrition*, 2022(1), 5715649. <https://doi.org/10.1155/2022/5715649>

Yolmeh, M., Xavier-Santos, D., & Sant'Ana, A. S. (2024). Modulating gut microbiota by paraprobiotics: mechanisms, advantages, and challenges. *Food Bioscience*, 104305. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104305>

Yuan, Y., Li, J., Lin, J., Pan, W., Chu, Y., Prithiviraj, B., Guo, Y., Wang, X., & Zhao, K. (2021). Extracellular products-mediated interspecific interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology*, 59, 29-40. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-0478-0>

Yúfera, M., & Darias, M. J. (2007). Changes in the gastrointestinal pH from larvae to adult in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 267(1-4), 94-99. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.009>

Zarantonello, A., Revel, M., Grunenwald, A., & Roumenina, L. T. (2023). C3-dependent effector functions of complement. *Immunological Reviews*, 313(1), 120-138. <https://doi.org/10.1111/imr.13147>

Zavišić, G., Ristić, S., Petričević, S., Janković, D., & Petković, B. (2024). Microbial contamination of food: probiotics and postbiotics as potential biopreservatives. *Foods*, 13(16), 2487. <https://doi.org/10.3390/foods13162487>

Zhang, Z., Yang, Q., Liu, H., Jin, J., Yang, Y., Zhu, X., Han, D., Zhou, Z., & Xie, S. (2024). Potential functions of the gut microbiome and modulation strategies for improving aquatic animal growth. *Reviews in Aquaculture*. <https://doi.org/10.1111/raq.12959>

Zhao, C., Wang, J., Ren, W., Zheng, S., & Ren, Y. (2024). Histological, immune, and intestine microbiota responses of the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to high temperature stress. *Aquaculture*, 582, 740465. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740465>

Zheng, Q., Chia, S. L., Saad, N., Song, A. A. -L., Loh, T. C., & Foo, H. L. (2024). Different combinations of nitrogen and carbon sources influence the growth and postbiotic metabolite characteristics of *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from Malaysian foods. *Foods*, 13(19), 3123. <https://doi.org/10.3390/foods13193123>

Zhou, C., Gao, P., & Wang, J. (2023). Comprehensive analysis of microbiome, metabolome, and transcriptome revealed the mechanisms of intestinal injury in rainbow trout under heat stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8569. <https://doi.org/10.3390/ijms24108569>

Zielińska, D., Sionek, B., & Kołożyn-Krajewska, D. (2018). Safety of probiotics. In Diet, microbiome and health (pp. 131-161). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811440-7.00006-5>

CONCLUSIONES





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

4. CONCLUSIONES

1. La cepa probiótica *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11) carece de plásmidos, reforzándose su carácter probiótico.
2. La administración en la dieta de SpPdp11 como paraprobiótico inactivado por calor a lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) modula la microbiota del intestino sin comprometer su inmunidad, observándose efectos similares a los que ejercería SpPdp11 administrado como células viables.
3. Las condiciones de cultivo del probiótico SpPdp11 influyen en su potencial postbiótico, especialmente la composición del medio de cultivo, con un efecto desfavorable del incremento de la salinidad.
4. Las microalgas, *Chlorella fusca*, *Tisochrysis lutea* y *Microchloropsis gaditana*, y la cianobacteria *Arthrospira platensis*, como sustrato para el cultivo de SpPdp11 tienen la capacidad de modular el potencial postbiótico de sus ECP.
5. Las proteínas expresadas diferencialmente en los ECP seleccionados se asocian con el metabolismo de aminoácidos y la capacidad antioxidante en los medios con pienso y microalgas/cianobacteria, y la quimiotaxis en el caso de medio con microalgas/cianobacteria.
6. Los ECP obtenidos a partir de T2348 y FM1548 de SpPdp11 reducen significativamente la transcripción *in vitro* del gen *aip56* en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, cepa Lg 41/01.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

PUBLICACIONES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Marta Domínguez Maqueda, Olivia Pérez Gómez, Ana Grande-Pérez, Consuelo Esteve, Pedro Seoane, Silvana Teresa Tapia-Paniagua, María Carmen Balebona, Miguel Ángel Moriñigo (2022). Pathogenic strains of *Shewanella putrefaciens* contain plasmids that are absent in the probiotic strain Pdp11. PeerJ 10:e14248.

Shewanella putrefaciens Pdp11 is a strain described as a probiotic for use in aquaculture. However, *S. putrefaciens* includes strains reported to be pathogenic or saprophytic to fish. Although the probiotic trait has been related to the presence of a group of genes in its genome, the existence of plasmids that could determine the probiotic or pathogenic character of this bacterium is unknown. In the present work, we searched for plasmids in several strains of *S. putrefaciens* that differ in their pathogenic and probiotic character. Under the different conditions tested, plasmids were only found in two of the five pathogenic strains, but not in the probiotic strain nor in the two saprophytic strains tested. Using a workflow integrating Sanger and Illumina reads, the complete consensus sequences of the plasmids were obtained. Plasmids differed in one ORF and encoded a putative replication initiator protein of the repB family, as well as proteins related to plasmid stability and a toxin-antitoxin system. Phylogenetic analysis showed some similarity to functional repB proteins of other *Shewanella* species. The implication of these plasmids in the probiotic or pathogenic nature of *S. putrefaciens* is discussed.

DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.14248>

Marta Domínguez Maqueda; Isabel María Cerezo Ortega, Silvana Teresa Tapia Paniagua, Inés García De la Banda, Xabier Moreno Ventas,; Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez, María Carmen Balebona Accino **(2021)**. A Tentative Study of the Effects of Heat-Inactivation of the Probiotic Strain *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on Senegalese Sole (*Solea senegalensis*) Intestinal Microbiota and Immune Response. *Microorganisms*. 9 - 4, pp. 808 - 808.

Concerns about safety, applicability and functionality associated with live probiotic cells have led to consideration of the use of non-viable microorganisms, known as paraprobiotics. The present study evaluated the effects of dietary administration of heat-inactivated cells of the probiotic strain *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on the intestinal microbiota and immune gene transcription in *Solea senegalensis*. Results obtained were evaluated and compared to those described after feeding with viable Pdp11 cells. *S. senegalensis* specimens were fed with basal (control) diet or supplemented with live or heat inactivated (60 °C, 1 h) probiotics diets for 45 days. Growth improvement was observed in the group receiving live probiotics compared to the control group, but not after feeding with a probiotic heat-inactivated diet. Regarding immune gene transcription, no changes were observed for *tnfa*, *il-6*, *lys-c1*, *c7*, *hsp70*, and *hsp90aa* in the intestinal samples based on the diet. On the contrary, *hsp90ab*, *gp96*, *cd4*, *cd8*, *il-1b*, and *c3* transcription were modulated after probiotic supplementation, though no differences between viable and heat-inactivated probiotic supplemented diets were observed. Modulation of intestinal microbiota showed remarkable differences based on the viability of the probiotics. Thus, higher diversity in fish fed with live probiotic cells, jointly with increased *Mycoplasmataceae* and *Spirochaetaceae* to the detriment of *Brevinemataceae*, was detected. However, microbiota of fish receiving heat-inactivated probiotic cells showed decreased *Mycoplasmataceae* and increased *Brevinemataceae* and *Vibrio* genus abundance. In short, the results obtained indicate that the viable state of Pdp11 probiotic cells affects growth performance and modulation of *S. senegalensis* intestinal microbiota. On the contrary, minor changes were detected in the intestinal immune response, being similar for fish receiving both, viable and inactivated probiotic cell supplemented diets, when compared to the control diet.

DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040808>.

Marta Domínguez-Maqueda, Jorge García-Márquez, Silvana T. Tapia-Paniagua, Carmen González-Fernández, Alberto Cuesta, Cristóbal Espinosa-Ruíz, María Ángeles Esteban, Francisco Javier Alarcón, María Carmen Balebona, Miguel Ángel Moriñigo (2023). Evaluation of the Differential Postbiotic Potential of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 Cultured in Several Growing Conditions. *Marine Biotechnology*, 1-18.

The increased knowledge of functional foods has led to the development of a new generation of health products, including those containing probiotics and products derived from them. *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11) is a strain described as a probiotic that exerts important beneficial effects on several farmed fish. However, the use of live probiotic cells in aquaculture has limitations such as uncertain survival and shelf life, which can limit their efficacy. In addition, its efficacy can vary across species and hosts. When probiotics are administered orally, their activity can be affected by the environment present in the host and by interactions with the intestinal microbiota. Furthermore, live cells can also produce undesired substances that may negatively impact the host as well as the risk of potential virulence reversion acquired such as antibiotic resistance. Therefore, new alternatives emerged such as postbiotics. Currently, there is no knowledge about the postbiotic potential of SpPdp11 in the aquaculture industry. Postbiotic refers to the use of bacterial metabolites, including extracellular products (ECPs), to improve host physiology. However, the production of postbiotic metabolites can be affected by various factors such as cultivation conditions, which can affect bacterial metabolism. Thus, the objective of this study was to evaluate the postbiotic potential of ECPs from SpPdp11 under different cultivation conditions, including culture media, temperature, growth phase, and salinity. We analyzed their hydrolytic, antibacterial, antiviral, and cytotoxic capacity on several fish cell lines. The results obtained have demonstrated how each ECP condition can exert a different hydrolytic profile, reduce the biofilm formation by bacterial pathogens relevant to fish, lower the titer of nervous necrosis virus (NNV), and exert a cytotoxic effect on different fish cell lines. In conclusion, the ECPs obtained from SpPdp11 have different capacities depending on the cultivation conditions used. These conditions must be considered in order to recover the maximum number of beneficial capacities or to choose the appropriate conditions for specific activities.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s10126-023-10271-y>

Marta Domínguez-Maqueda, Olivia Pérez-Gómez, Jorge García-Márquez, Cristóbal Espinosa-Ruíz, Alberto Cuesta, María Ángeles Esteban, Francisco Javier Alarcón, Casimiro Cárdenas, Silvana T. Tapia-Paniagua, María Carmen Balebona, Miguel Ángel Moriñigo (2024). Microalgae and cyanobacteria as microbial substrate and their influence on the potential postbiotic capability of a bacterial probiotic. *Microbial Biotechnology*, 17(11), e70046.

Postbiotics are metabolic by-products from microorganisms that provide health benefits to the host. Their secretion can be influenced by various conditions affecting bacterial metabolism. This study presents a novel approach for producing potential postbiotics, specifically extracellular products (ECPs), from the probiotic strain *Shewanella putrefaciens* SpPdp11, grown under different culture conditions. These conditions include aquafeed media, with partial or total microalgae/cyanobacteria replacement as the microbial substrate, as well as variations in temperature and growth phase. The use of microalgae/cyanobacteria as substrates may represent a valuable strategy for generating novel postbiotics with unique properties. The ECPs assessed were evaluated for their in vitro cytotoxic, hydrolytic and antimicrobial activities. Three conditions (ECPs derived from aquafeed media with partial (FM2324 and FM1548) or total (M2324) microalgae/cyanobacteria replacement) were non-cytotoxic to various fish cell lines and hydrolysed key nutritional compounds (casein, lipids, amylase and gelatin). Proteomic analysis of these ECP conditions revealed common structural and regulatory DNA-associated proteins, while differentially expressed proteins were associated with amino acid metabolism and antioxidant system (FM2324 and FM1548) and chemotaxis system (M2324). The results highlight the potential of the selected postbiotics as feed additives for future in vivo studies, aligning with sustainable development for aquaculture.

DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.70046>.

Marta Domínguez-Maqueda, Cristóbal Espinosa-Ruíz, María Ángeles Esteban, Francisco Javier Alarcón, Silvana T. Tapia-Paniagua, María Carmen Balebona, Miguel Ángel Moriñigo (2024). An ex vivo approach in European seabass leucocytes supports the in vitro regulation by postbiotics of Aip56 gene expression of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 1-15.

Shewanella putrefaciens Pdp11 (SpPdp11) is a probiotic strain assayed in aquaculture; however, its postbiotic potential is unknown. Postbiotics are bacterial metabolites, including extracellular products (ECPs) that improve host physiology and immunity. Their production and composition can be affected by different factors such as the growing conditions of the probiotics. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strain Lg 41/01 (Phdp) is one of the most important pathogens in marine aquaculture. The major virulent factor of this bacterium is the exotoxin aip56, responsible for inducing apoptosis of fish leucocytes. Viable SpPdp11 cells have been reported to increase resistance to challenges with Phdp. This work aimed to evaluate the effect of two ECPs, T2348-ECP and FM1548-ECP, obtained from SpPdp11 grown under different culture conditions that previously demonstrated to exert different degradative and non-cytotoxic activities, as well as the effect on pathogens biofilm formation. These SpPdp11-ECPs were then analyzed by their effect on the viability, phagocytosis, respiratory burst and apoptogenic activity against European sea bass leucocytes infected or not with Phdp supernatant. Both ECPs, T2348-ECP and FM1548-ECP, were not cytotoxic against leucocytes and significantly reduced their apoptosis. Phagocytosis and respiratory burst of leucocytes were significantly reduced by incubation with Phdp supernatant, and not influenced by incubation with T2348-ECP or FM1548-ECP. However, both activities were significantly increased after leucocyte incubation with combined T2348-ECP and FM1548-ECP with Phdp supernatant, compared to those incubated only with Phdp supernatant. Finally, both T2348-ECP and FM1548-ECP significantly reduced the relative in vitro expression of the Phdp aip56 encoding gene.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10255-x>.