



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Doctorado en Ciencias, Mención  
Microbiología

**PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE SELENIO EN *PANTOEA*  
*AGGLOMERANS* Y *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* Y SU  
APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA COMO SUPLEMENTO DIETÉTICO PARA  
PECES SALMÓNIDOS**

**FRANCISCO ORLANDO YÁÑEZ LEMUS**

Tesis presentada a:

Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción

Para optar al Grado de:

Doctor en Ciencias, Mención Microbiología

CONCEPCION (Chile), 2022

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

**Profesores integrantes Comisión Evaluadora:**

---

**Dr. Víctor Campos Araneda**

Profesor Guía de Tesis  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción  
Director

---

**Dr. Carlos Smith Gallardo**

Profesor Co-Guía de Tesis  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

**Dra. Apolinaria García Cancino**

Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción  
Evaluador interno



---

**Dr. José Becerra Allende**

Facultad de Ciencias Naturales y  
Oceanográficas  
Universidad de Concepción  
Evaluador interno

---

**Dr. Víctor Hernández Santander**

Facultad de Ciencias Naturales y  
Oceanográficas  
Universidad de Concepción  
Evaluador interno

---

**Dr. Rubén Moraga**

Facultad de Recursos Naturales  
Renovables  
Universidad Arturo Prat  
Evaluador externo

---

**Dr. Miguel Martínez Poblete**

Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción  
Director(S)

**Tesis financiada por:**

Proyecto VRID N° 217.036.045-1.0 de la Universidad de Concepción



## AGRADECIMIENTOS

Desde su concepción, esta tesis doctoral requirió de mucho esfuerzo y dedicación que, sin la cooperación material, intelectual y/o espiritual de muchas personas, no habría sido posible su finalización.

Ante todo agradecer a Dios, a la Santísima Virgen María, a San José y a mi queridísimo Ángel de la guarda por guiar mis pasos, fortalecer mi corazón e iluminar mi intelecto para poder resolver adecuadamente situaciones que consideré negativas en lo personal y en el marco de la investigación y que, en múltiples instancias sentí, serían las vencedoras. Gracias por permitirme comprender que mi capacidad intelectual no es un tesoro personal, sino mi ofrenda y responsabilidad para con el bienestar de la sociedad y un puñadito de arena para la construcción de la obra de Dios.

Agradezco a mi familia, en especial a mis padres Francisco y María Angélica y a mis hijas Javiera y Francisca que creyeron siempre en mí y me brindaron el apoyo por excelencia, aquel fraguado en amor incandescente en el horno de nuestra vida, el corazón, y que permite el rehacernos para salir de fosas de desesperanzas e inseguridades.

Agradezco al director del programa del doctorado, tutor de tesis y amigo el Dr. Víctor Campos Araneda, por el constante apoyo humano, técnico y económico que constantemente brindó y que me permitió comprender aspectos, para mí desconocidos, del ser y del saber ser científico en el marco de la honestidad y la ética científica. Gracias por inculcar aún más el amor por la ciencia como un valor humanizador.

Agradezco al Dr. Carlos Smith Gallardo por su gran paciencia y dedicación para conmigo, ofreciendo amablemente su tiempo, horas de sueño y valiosos consejos que ciertamente enriquecieron el presente trabajo doctoral y mi visión de ciencia y fortalecieron mis competencias en la redacción de un trabajo científico.

Agradezco al Dr. Luis Mercado Vianco de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, por regalar su tiempo y facilitar tan amablemente dependencias, equipamiento, líneas celulares y cultivo primario de trucha arcoíris, sin las cuales, no habría sido posible la concreción exitosa de un objetivo del presente trabajo doctoral.

Agradezco al Dr. Carlos Jara Gutiérrez del Laboratorio de Investigación en Estrés Oxidativo de la Universidad de Valparaíso, por regalar su tiempo y facilitar tan amablemente dependencias y equipamiento para realizar análisis de capacidades antioxidantes *in vitro* de las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys. Sin su colaboración, no habría sido posible la concreción exitosa de un objetivo del presente trabajo doctoral.

Agradezco al Dr. Carlos González Correa por su siempre amable disposición para conmigo y gestión que permitió el ser parte como estudiante del programa internacional, Diploma en Estudios Avanzados en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Freiburg, en la ciudad de Freiburg, Alemania.

Agradezco a los miembros de la comisión evaluadora de la presente tesis doctoral quienes ofrecieron amable y constantemente su ayuda para la confección de un mejor trabajo doctoral.

Agradezco a mis compañeros del doctorado por todo el ánimo, toda la paciencia, por confiar y creer en mí y, sobre todo, por su valiosa amistad.

Finalmente agradezco a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo el hermoso y extenuante proceso de realización de esta tesis doctoral, con sus altos y bajos, y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

¡Qué Dios bendiga a toda persona involucrada de una u otra forma en el proceso que culminó con esta tesis y la obtención del grado de Doctor!

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>4</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>6</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>8</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y ASPECTOS GENERALES</b>	<b>15</b>
INTRODUCCIÓN	16
ANTECEDENTES GENERALES	24
1. Aspectos generales del tracto intestinal de peces salmónidos	24
1.1. Morfología macroscópica del intestino	25
1.2. Morfología microscópica y generalidades funcionales del intestino	27
1.3. Digestión y absorción de nutrientes en peces	31
2. Nutrición mineral en peces	33
3. El Selenio	36
3.1. El Se en el ambiente	36
3.2. Metabolismo del Se en peces	39
3.2.1. Requerimientos	42
3.2.2. Deficiencia	43
3.2.3. Toxicidad	44
3.2.4. Biodisponibilidad	45
3.3. Nanopartículas de Se	46
3.3.1. Aplicaciones y usos de las Se <sup>0</sup> Nps	48
<b>CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>52</b>
1. HIPÓTESIS	53
2. OBJETIVOS	54
2.1. Objetivo General	54
2.2. Objetivos específicos	54

<b>CAPÍTULO III: OBJETIVOS ESPECÍFICOS 1 Y 2:</b>	<b>55</b>
SELENIUM NANOPARTICLES BIOSYNTHESIZED BY <i>PANTOEA</i> AGGLOMERANS AND THEIR EFFECTS ON CELLULAR AND PHYSIOLOGICAL	
Abstract	<b>56</b>
1. Introduction	<b>56</b>
2. Material and Methods	<b>58</b>
3. Results	<b>65</b>
4. Discussion	<b>76</b>
5. Conclusions	<b>80</b>
6. References	<b>81</b>
<b>CAPÍTULO IV: OBJETIVOS 3 Y 4</b>	<b>90</b>
SELENIUM NANOPARTICLE-ENRICHED AND A POTENTIAL PROBIOTIC, THE STRAIN <i>LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM</i> S14 AS NUTRITIONAL SUPPLEMENT TO IMPROVE PHYSIOLOGICAL AND PRODUCTIVE PARAMETERS OF RAINBOW TROUT <i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i>	
Abstract	<b>91</b>
1. Introduction	<b>91</b>
2. Materials and Methods	<b>94</b>
3. Results	<b>105</b>
4. Discussion	<b>117</b>
5. Conclusions	<b>124</b>
6. References	<b>125</b>
<b>CAPÍTULO V: DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>141</b>
Discusión	<b>142</b>
<b>CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES</b>	<b>157</b>
Conclusiones	<b>158</b>
<b>CAPÍTULO VII: REFERENCIAS</b>	<b>160</b>
Referencias	<b>161</b>
<b>CAPÍTULO VIII: ANEXOS</b>	<b>191</b>
Proyecciones	<b>192</b>
Sobre el autor	<b>193</b>
Artículos científicos generados durante el Doctorado	<b>193</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Dibujo esquemático del tracto gastrointestinal de un pez salmónido que incluye estructuras principales de acuerdo según segmento. **26**

### CAPÍTULO III

**Figure 1.** Selenium nanoparticles produced by *Pantoea agglomerans* UC-32 strain without functionalization (Se<sup>0</sup>Nps) and after L-cysteine functionalization (Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys). **66**

**Figure 2.** Cell viability of cell lines RTS-11, RTgill-W1 and the primary culture T-PHKM treated with Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> and then subjected to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a ROS inducing agent. **72**

**Figure 3.** Level of intracellular ROS on cell lines RTS-11, RTgill-W1 and of the primary culture T-PHKM treated with Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> and then subjected to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a ROS inducing agent. **73**

### CAPÍTULO IV

**Figure 1.** Antibiotic susceptibility of the 5 LAB strains (LABS2, LABS4, LABS8, LABS13 and LABS14), obtained from the intestinal content of rainbow trout to the antimicrobials gentamycin (GEN), tetracycline (TET), oxytetracycline (OXY), erythromycin (ERY), florfenicol (FLO), and ampicillin (AMP), evaluated by the disc diffusion antibiotic method. **109**

**Figure 2.** LABS14-Se<sup>0</sup>Nps. **A:** TEM micrograph of LABS14 showing a bacillar morphology bacterium with nanoparticles attached to the cell surface (black arrow); **B:** SEM micrograph showing nanoparticles attached to the bacterial surface (white arrow); **C:** SEM-EDS data confirmation of the presence of Se in the nanoparticles (Se<sup>0</sup>Nps). **113**



## ÍNDICE DE TABLAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabla 1.</b> Compuestos de selenio de importancia biológica	<b>37</b>
--	-----------

### CAPÍTULO III

<b>Table 1.</b> In vitro radical scavenging capacity of 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ $\text{Se}^0\text{Nps/L-Cys}$ , $\text{Se}^0\text{Nps}$ and $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .	<b>67</b>
---	-----------

<b>Table 2.</b> Effect of $\text{Se}^0\text{Nps/L-Cys}$ or $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ on the cell viability of cell lines RTgill-W1, RTS-11 and T-PHKM.	<b>68</b>
--	-----------

<b>Table 3.</b> Plasma lysozyme activity (in $\text{U mL}^{-1}$ ) in rainbow trout fed with 5 $\text{mg kg}^{-1}$ Se dry diet supplemented food for 30 days.	<b>74</b>
--	-----------

<b>Table 4.</b> ROS production by blood leukocytes, evaluated by NBT reduction into formazan, in rainbow trout. Fish were fed with 5 $\text{mg kg}^{-1}$ Se dry diet supplemented food for 30 days.	<b>74</b>
---	-----------

<b>Table 5.</b> Glutathione peroxidase (Gpx) activity in rainbow trout fed with 5 $\text{mg kg}^{-1}$ Se dry diet supplemented food at day 30.	<b>75</b>
--	-----------

<b>Table 6.</b> Growth performance and survival rate of rainbow trout fed with 5 $\text{mg kg}^{-1}$ Se dry diet supplemented food for 30 days.	<b>76</b>
---	-----------

### CAPÍTULO IV

<b>Table 1.</b> Performance standards for antimicrobial susceptibility testing by the disc diffusion antibiotic method and classification of antibiotics used in this study.	<b>98</b>
--	-----------

<b>Table 2.</b> Morphological characteristics and catalase activity of 16 isolates obtained from the intestinal content of rainbow trout.	<b>106</b>
---	------------

<b>Table 3.</b> Fermentation pattern of hexoses (glucose, fructose or galactose) or pentoses (ribose, xylose or arabinose) of isolates S2, S4, S8, S12, S13 and S14 obtained from the intestinal content of rainbow trout when cultured in MRS broth plus phenol red.	<b>107</b>
---	------------

**Table 4.** Antibacterial activity of LAB strains (LABS2, LABS4, LABS8, LABS12, LABS13 and LABS14) isolated from the intestinal content of rainbow trout against indicator strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 10145. **108**

**Table 5.** Type of hemolytic activity on MRS agar plus 5% human blood after 24 h, 48 h and 72 h incubation at 37°C of the selected LAB strains obtained from the intestinal content of rainbow trout. **110**

**Table 6.** Tolerance to acidic pH and 0.3% bile salts, evaluated by viability, of LABS4 and LABS14 strains isolated from the intestinal content of rainbow trout incubated for 4 h at 37 °C at pH 3 or in the presence of 0.3% (w/v) bile salts. **112**

**Table 7.** ROS production by rainbow trout blood leukocytes, evaluated by NBT reduction into formazan. Fish were fed  $10^8$  CFU LABS14-Se<sup>0</sup>Nps g<sup>-1</sup> or  $10^8$  CFU LABS14 g<sup>-1</sup> supplemented dry food for 30 days. **114**

**Table 8.** Plasma lysozyme activity (U mL<sup>-1</sup>) in rainbow trout fed with  $10^8$  CFU LABS14-Se<sup>0</sup>Nps g<sup>-1</sup> or  $10^8$  CFU LABS14 g<sup>-1</sup> supplemented dry food for 30 days. **115**

**Table 9.** Glutathione peroxidase (Gpx) activity in rainbow trout fed with  $10^8$  CFU LABS14-Se<sup>0</sup>Nps g<sup>-1</sup> or  $10^8$  CFU LABS14 g<sup>-1</sup> supplemented dry food for 30 days. **115**

**Table 10.** Growth performance and survival rate of rainbow trout fed with  $10^8$  CFU LABS14-Se<sup>0</sup>Nps g<sup>-1</sup> or  $10^8$  CFU LABS14 g<sup>-1</sup> supplemented dry diet food for 30 days. **116**

## RESUMEN

El selenio (Se) es un micronutriente traza esencial para la salud de humanos, animales y microorganismos. Las nanopartículas de selenio ( $\text{Se}^0\text{Nps}$ ) atraen el interés de la ciencia y de diferentes áreas industriales debido a su biocompatibilidad, biodisponibilidad y baja toxicidad. Por lo tanto, debido a su mayor bioactividad, las  $\text{Se}^0\text{Nps}$  se están utilizando en diversas aplicaciones biomédicas y productivas. En general,  $\text{Se}^0\text{Nps}$  pueden ser sintetizadas mediante métodos físicos, químicos y biológicos. Sin embargo, las  $\text{Se}^0\text{Nps}$  sintetizadas biológicamente demuestran una mayor compatibilidad con órganos y tejidos, humanos y animales.

El objetivo del presente estudio fue biosintetizar  $\text{Se}^0\text{Nps}$  en *Pantoea agglomerans* UC-32 y *Lactiplantibacillus plantarum* S14 y evaluar su potencial biotecnológico como suplemento nutricional para el mejoramiento del estado oxidativo, desempeño inmunológico y parámetros productivos en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo.

Evaluamos el efecto de las  $\text{Se}^0\text{Nps}$  funcionalizadas con L-cisteína ( $\text{Se}^0\text{Nps}/\text{L-Cys}$ ), como suplemento nutricional, sobre el estado inmunológico, oxidativo y parámetros productivos en *O. mykiss*. TEM y SEM-EDS mostraron la acumulación de  $\text{Se}^0\text{Nps}$  esféricas compuestas por selenio elemental ( $\text{Se}^0$ ) como depósitos intracelulares y extracelulares en *Pantoea agglomerans* UC-32. La capacidad antioxidante in vitro de  $\text{Se}^0\text{Nps}/\text{L-Cys}$  fue significativamente más eficiente en la captura de ROS que  $\text{Se}^0\text{Nps}$  y  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . También evaluamos el efecto de  $\text{Se}^0\text{Nps}/\text{L-Cys}$  sobre la viabilidad celular y el estrés oxidativo en las líneas celulares RTgill-W1 y RTS-11 y cultivo celular T-PHKM de *O. mykiss*.  $\text{Se}^0\text{Nps}/\text{L-Cys}$  mostró ser menos tóxica y con mayor actividad antioxidante comparada con  $\text{Se}^0\text{Nps}$  y  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Finalmente, la dieta  $\text{Se}^0\text{Nps}/\text{L-Cys}$  tuvo un efecto significativamente mayor en la actividad de la lisozima plasmática y la actividad del estallido respiratorio (respuesta inmunitaria innata), en la actividad de la Gpx tisular (estado oxidativo) y en la acumulación de reservas energéticas y bienestar (parámetro productivo) en los peces cuando se comparó con el efecto de las  $\text{Se}^0\text{Nps}$  y del  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .

También obtuvimos bacterias ácido-lácticas (LAB) a partir del contenido intestinal de trucha arcoíris. De estas, se seleccionaron candidatos probióticos con capacidad de biosintetizar  $\text{Se}^0\text{Nps}$ . Para determinar la potencialidad probiótica, cada cepa LAB fue

evaluada mediante caracterización morfológica y las siguientes pruebas: actividad antimicrobiana, susceptibilidad antibiótica, actividad hemolítica, catalasa, hidrofobicidad, viabilidad a pH bajo y tolerancia a sales biliares. Dos cepas de LAB (S4 y S14) cumplieron con características de probióticos potenciales, pero la cepa S14 redujo  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  y biosintetizó  $\text{Se}^0\text{Nps}$ . La cepa S14 se identificó, mediante análisis de ADNr 16S, como *Lactiplantibacillus plantarum*. Mediante microscopía electrónica se observó  $\text{Se}^0\text{Nps}$  de 98 a 245 nm de diámetro ubicadas en la superficie celular de S14. La dieta de la trucha arcoíris fue suplementada con  $10^8$  UFC  $\text{g}^{-1}$  de materia seca de alimento de *Lp plantarum* S14 enriquecida con  $\text{Se}^0\text{Nps}$  (LABS14- $\text{Se}^0\text{Nps}$ ) o sólo con  $10^8$  UFC  $\text{g}^{-1}$  de materia seca de alimento de *Lp. plantarum* S14 (LABS14) durante 30 días. Los días 0, 15 y 30 se tomó medidas morfométricas y muestras sanguíneas y el día 30 además, se obtuvo tejido hepático y muscular de ambos grupos, más controles (sin suplementación dietética). La suplementación dietaria con LABS14- $\text{Se}^0\text{Nps}$  mejoró significativamente las actividades de la lisozima plasmática, el estallido respiratorio, la Gpx tisular y parámetros productivos en comparación con los peces suplementados con LABS14 y los controles.

Consideramos que las  $\text{Se}^0\text{Nps/L-Cys}$  y las LABS14- $\text{Se}^0\text{Nps}$  son un aporte biotecnológico fácil de implementar, con un reducido impacto ambiental y con potencialidad de ser usadas por la industria salmonicultora como un suplemento nutricional capaz de mejorar parámetros fisiológicos y productivos en la trucha arcoíris.

En consecuencia, las hipótesis planteadas en esta tesis fueron aceptadas.

## ABSTRACT

Selenium (Se) is a trace and essential micronutrient for the health of humans, animals, and microorganisms. Selenium nanoparticles (Se<sup>0</sup>Nps) attract the interest of science and different industrial areas due to their biocompatibility, bioavailability, and low toxicity. Therefore, due to their higher bioactivity selenium nanoparticles are largely being used in various biomedical and productive applications. Generally, selenium nanoparticles can be synthesized by physical, chemical, and biological methods. However, the biologically synthesized Se<sup>0</sup>Nps demonstrate greater compatibility with human and animal organs and tissues.

The aim of this study was to biosynthesize Se<sup>0</sup>Nps in *Pantoea agglomerans* UC-32 and *Lactiplantibacillus plantarum* S14 and to evaluate its biotechnological potential as nutritional supplement for the improvement of the oxidative state, immunological performance, and productive parameters in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

We evaluate the effect of Se<sup>0</sup>Nps biosynthesized by *P. agglomerans* and functionalized with L-cysteine (Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys), as a nutritional supplement, on immunological, oxidative status, and productive parameters in *O. mykiss*. TEM and SEM-EDS showed the accumulation of spherical Se<sup>0</sup>Nps entirely composed by elemental selenium (Se<sup>0</sup>) as intracellular and extracellular deposits in *P. agglomerans* UC-32 strain. The in vitro antioxidant capacity of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys was significant more efficient ROS scavengers than Se<sup>0</sup>Nps and Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. We also evaluate the effect of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys on cell viability and oxidative stress in RTgill-W1, RTS-11, or T-PHKM *O. mykiss* cell lines. Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys showed less toxic and high antioxidant activity than Se<sup>0</sup>Nps and Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. Finally, the dietary Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys had a significant better effect on both plasma lysozyme and respiratory burst activity (innate immune response), on tissular Gpx activity (oxidative status), and on well-being (productive parameter) of *O. mykiss* when it is compared to Se<sup>0</sup>Nps and Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>.

We also obtained lactic acid bacteria (LAB) from rainbow trout intestine. They were cultured in MRS medium and probiotic candidates concurrently producers Se<sup>0</sup>Nps were selected. Probiotic candidates were subjected to morphological characterization and the following tests: antimicrobial activity, antibiotic susceptibility, hemolytic activity, catalase, hydrophobicity, viability at low pH and tolerance to bile salts. Two LAB strains (S4 and S14) satisfied the characteristics of potential probiotics, but strain S14, reduced selenite to

biosynthesize Se<sup>0</sup>Nps. S14 strain was identified, by 16S rDNA analysis, as *Lactiplantibacillus plantarum*. Electron microscopy showed Se<sup>0</sup>Nps measuring 98 to 245 nm on the surface of S14 strain cells. Rainbow trout diet was supplemented (10<sup>8</sup> CFU g<sup>-1</sup> feed) with Se<sup>0</sup>Nps-enriched *Lp. plantarum* S14 (LABS14-Se<sup>0</sup>Nps) or *Lp. plantarum* S14 alone (LABS14) for 30 days. At days 0, 15 and 30 samples (blood, liver and dorsal muscle) were obtained of both groups, plus controls lacking diet supplementation. Diet supplementation with LABS14-Se<sup>0</sup>Nps significantly improved fish plasma lysozyme, respiratory burst (innate immune response) and tissular glutathione peroxidase (oxidative status) activities and productive parameters of *O. mykiss* when compared to fish supplemented with LABS14 and controls.

We consider that Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys and LABS14-Se<sup>0</sup>Nps are a biotechnological contribution easy to implement with a reduced environmental impact and with the potential to be used by the salmon farming industry as a nutritional supplement capable of improving physiological and productive parameters in trout rainbow.

Consequently, the hypotheses have been proposed in this thesis, were accepted.



# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN Y ASPECTOS GENERALES



## INTRODUCCIÓN

La creciente demanda mundial de alimentos requiere de un dinamismo progresivo del sector productivo acuícola que propenda hacia transformaciones en los sistemas de producción, las que deberían ser implementadas a partir de políticas y legislaciones enfocadas hacia el mejor uso de los recursos y del espacio disponible [1]. El panel intergubernamental sobre cambio climático (IPCC) del 2019, concluye que es imperativo que los lineamientos de la producción sostenible de alimentos integren el uso eficiente de los recursos disponibles y la reducción de emisiones que impacten negativamente al ambiente [2].

La producción de alimentos basada en la tierra tiene el mayor impacto climático y, por lo tanto, la industria productora de alimentos no podrá seguir creciendo a menos que se implementen métodos sostenibles [3]. El mayor potencial para aumentar la producción de alimentos se encuentra en los océanos; sin embargo, la obtención de mayores volúmenes de materia prima debería provenir del cultivo de peces y no desde la extracción directa de cardúmenes, pues cerca del 85% de las especies de peces no cultivadas y utilizadas para la elaboración de alimento, están sobreexplotadas [4].

De acuerdo con un informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), para el 2030 se proyecta un incremento de la producción acuícola superior al 50% en relación con la producción actual, estimándose la elaboración de más de 185 millones de toneladas métricas (tm) de materia prima y productos procesados [5]. No obstante, para que el sistema acuícola global alcance dicho nivel de producción primero deberá asegurar la disponibilidad de más de 285 millones de tm de alimento para la nutrición de los animales en cultivo [6].

En el 2020, la producción acuícola global se incrementó un 2,7% en relación con lo informado el 2019, registrando 122,6 millones de tm. De estas, 87,5 millones correspondieron a animales acuáticos, y entre estos, la producción de peces representó cerca del 90% del volumen total de animales cultivados en el mundo y que, traducidos en retornos para la industria piscícola, superó los 264 mil millones de dólares [5].



De acuerdo con el reporte de la FAO del 2020 [5], Asia, produce sobre el 88% del volumen total de peces en el mundo, seguido de Europa con el 4,39% y en tercer lugar América con un 4,35% [5]. Históricamente, Asia ha demostrado una vocación piscícola preponderante en el orbe, caracterizada por sistemas de producción mayoritariamente rurales, implementados en agua dulce y con una baja tasa de tecnologización [6].

Por su parte, en los últimos 20 años, la industria acuícola productora de peces en Europa y América ha mostrado un mayor dinamismo y tasas de crecimiento proporcional a lo observado en otros continentes [7]. De acuerdo con Iversen *et al.* [7], este sistema de producción se desarrolla mayoritariamente en aguas marinas y se caracteriza por su alta eficiencia y el mejoramiento continuo de índices productivos, dada la constante introducción de nuevas tecnologías. Noruega y Chile son los países que demuestran una mayor capacidad productiva de peces en Europa y América, respectivamente [5], y son considerados los mayores productores de peces salmónidos en el mundo [7].

Noruega ha sido líder mundial en producción de salmones desde 1960, cuando la industria salmonicultora de este país incluyó metodologías y tecnologías de producción pioneras. Desde entonces, la producción de salmón noruego ha aumentado constantemente desde 600 tm en 1974 [8] hasta alrededor de 1.400.000 tm durante 2020, representando actualmente el 53% de la producción mundial de salmónidos [5].

En Chile las actividades relacionadas con la salmonicultura se remontan a fines del siglo XIX y tenían esencialmente fines recreativos, deportivos, de experimentación y exploración de su viabilidad. No fue hasta fines de la década de 1970 cuando la industria salmonicultora inició su etapa de desarrollo comercial en el país [9].

De acuerdo con Hosono [9], las primeras manifestaciones de una industria salmonicultora con perspectiva de competitividad a un nivel global, se hicieron patente durante la primera mitad de la década de los 80, luego de que se hiciera efectiva la relación tripartita entre la Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA), el gobierno de Chile, a través del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) y las empresas productoras de peces salmónidos. A esta interacción, destinada al fortalecimiento de las capacidades productivas de la salmonicultura chilena se le llamó, "Proyecto Salmón Chile-Japón" y es consignada como el hito fundamental, responsable del rápido crecimiento y

competitividad de esta industria y, por ende, del segundo lugar que Chile actualmente ocupa en el mercado acuícola mundial con una producción de salmónidos que representa cerca del 30% del volumen global [5]. Durante el primer trimestre del 2022, y desagregado por especie cultivada, el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), es la especie que representó el 61% del total de peces salmónidos exportados, seguido del salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) con el 34% y la trucha arcoíris (*O. mykiss*) con el 5% [10].

Tanto la industria salmonicultora chilena como la noruega, han informado del incremento progresivo de los costos de producción como consecuencia, principalmente de las readecuaciones productivas destinadas a reducir y, en muchos casos remediar, el impacto ambiental de sus operaciones, a limitar las altas tasas de mortalidad por la emergencia de enfermedades infecciosas, y a explorar nuevas fuentes de nutrientes dada reducción de la disponibilidad de materia prima destinada a la producción de alimento para los peces [7].

El éxito de la salmonicultura es debido, en gran parte, a la alta intensidad de la producción, la que se caracteriza por una elevada densidad de peso vivo de pez por metro cúbico de agua. Sin embargo, este tipo de producción ha sido señalado como un factor determinante de enfermedades infecciosas dada la mantención de una elevada carga de microorganismos en la columna de agua y a la alta tasa de contacto entre los peces, determinando, entre otros, estrés, inmunosupresión y presentaciones frecuentes de erosiones y heridas cutáneas que favorecen el ingreso de microorganismos, a través, del epitelio dañado [11].

En concordancia con lo previamente mencionado, la competitividad de la salmonicultura chilena se justifica a partir de políticas industriales que han favorecido el incremento progresivo de la densidad de cultivo [12]. Paradójicamente, esta estrategia productiva ha sido determinante en la presentación de eventos sanitarios infecciosos que, a lo largo de la historia de la salmonicultura nacional, han puesto en tela de juicio su viabilidad, dada las altas mortalidades registradas [11].

En la década de los 90, la emergencia de la enfermedad bacteriana del riñón y la piscirickettsiosis, causadas por *Renibacterium salmoninarum* y *Piscirickettsia salmonis*, respectivamente, causó elevadas tasas de mortalidad como consecuencia directa de la virulencia de los agentes mencionados y de la eliminación de miles de peces infectados que

sobrevivieron pero que fueron considerados diseminadores potenciales de estos agentes bacterianos [11].

A partir de la presentación masiva de estas patologías, es que se inició la administración constante de antibióticos a los peces como una medida dirigida a prevenir la presentación de estas y otras enfermedades bacterianas [13,14]. El incremento del volumen de antibióticos usados por la industria salmonicultora chilena en las últimas 3 décadas, ha determinado su consideración como la actividad productiva que consume el mayor volumen de antibióticos por tm de cosecha en el mundo [14]. La sobreutilización de agentes microbianos ha provocado profundas alteraciones ecosistémicas locales [14].

De acuerdo con Watts *et al.* [15] la administración de antibióticos a los salmónidos se lleva a cabo principalmente medicando el alimento, por lo que, en los piensos no digeridos y el material fecal de los peces es posible pesquisar concentraciones de antibióticos no absorbidos. Estos autores agregan que entre el 70 y 80% de las moléculas antibióticas administradas a los peces son excretadas al agua alterando las comunidades microbianas y la biodiversidad de los sedimentos, contribuyendo a la adquisición de resistencia a agentes antibióticos, por parte de las bacterias del medio.

De acuerdo con observaciones realizadas por Hornick & Buschmann [16], en distintos centros de cultivo de salmónidos en el sur de Chile, la diversidad bacteriana en un área de cultivo es reducida en comparación con un área donde no está presente dicha actividad económica (área control), y pareciera ser, que la función de estas bacterias en el ecosistema también es diferente a la observada en el área control. La disminución de la diversidad biológica producida por el uso excesivo de antimicrobianos también facilita las infecciones bacterianas en los salmónidos cultivados, situación paradójicamente observada en la presentación de piscirickettsiosis [17]. A modo de ejemplo, aproximadamente, la mitad de los aislados de *P. salmonis* en Chile son resistentes a quinolonas, lo que refleja el extenso uso previo de estos terapéuticos en la industria [17].

En los años 2010 y 2014, se reportó la presentación de una nueva enfermedad ulcerativa-necrotizante que determinó mortalidades masivas y cuyas lesiones fueron observadas principalmente en la mandíbula, base de la aleta caudal y las branquias de salmones del Atlántico (*Salmo salar*) de entre 480 a 520 g cultivados en centros ubicados en

las inmediaciones de Puerto Montt, región de Los Lagos [18]. De acuerdo con Avendaño-Herrera *et al.* [18], el agente etiológico involucrado en estos eventos fue la bacteria Gram negativa de morfología bacilar de entre 5 a 8  $\mu\text{M}$  de longitud, denominada *Tenacibaculum dicentrarchi*. Durante marzo de 2020, centros de cultivo, igualmente de la región de los Lagos, reportaron presentaciones lesionalmente similares a las anteriormente descritas en *S. salar* pero que, esta vez, fueron observadas en truchas arcoíris de aproximadamente 250 g, causando una mortalidad de 17.554 peces [19]. Los análisis microbiológicos a los aislados obtenidos desde las lesiones de las truchas afectadas permitieron la identificación, por primera vez en el mundo, de *Tenacibaculum maritimum* como agente causante de tenacibaculosis en la trucha arcoíris [19]. La tenacibaculosis sin duda traerá nuevos retos terapéuticos que vayan en concordancia con la tendencia mundial del mercado de peces de cultivo de requerir la reducción del uso de agentes antimicrobianos en el proceso de producción.

Históricamente, la nutrición de los salmónidos de cultivo se ha basado en proteínas y aceites obtenidos de peces como la anchoveta (*Engraulis ringens*) [20]. De acuerdo con Ytrestøyl *et al.* [21], la reducción de las tasas de captura de peces marinos ha implicado un incremento del costo de la materia prima para la elaboración de alimentos destinada al cultivo de peces carnívoros como los salmónidos. La industria productora de alimento para estos peces ha debido explorar alternativas de materias primas para la elaboración de piensos cuyo aporte nutricional permita el mantener el nivel de competitividad que la salmonicultura ha reportado a la fecha [22].

La incorporación de ingredientes de origen vegetal en la elaboración de alimento para salmónidos es actualmente una práctica común [22]. Dentro de las principales fuentes de nutrientes se incluyen granos (ej. maíz, trigo), semillas oleosas (ej. soya, maravilla, raps) y legumbres (ej. frijoles, lupino, arveja) [20]. Sin embargo, el reemplazo de ingredientes de origen animal por ingredientes de origen vegetal, ha traído una serie de problemas en la formulación alimentaria, entre las que se destaca, la alta variabilidad en la concentración de aminoácidos, incluso entre vegetales de la misma especie, la baja concentración de proteínas por kg de materia seca en comparación con la presente en el material cárnico y aceites obtenidos de peces, y la presencia de factores anti nutricionales que interfieren principalmente con la utilización del alimento, la salud y el logro de objetivos productivos [23].

De acuerdo con Francis *et al.* [24], los factores anti nutricionales pueden ser clasificado considerando su labilidad frente a altas temperaturas. A modo de ejemplo, los taninos y el ácido fítico son termorresistentes por lo que, dentro del proceso de cocción durante la fabricación del alimento extruido, no son degradados [20]. Los taninos se unen preferentemente a proteínas y minerales reduciendo su tasa de absorción intestinal [25, 26] y el ácido fítico reduce la biodisponibilidad de minerales y produce lesiones en ciegos pilóricos en el salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) [27].

En consecuencia, el impacto ambiental derivado de las operaciones de la salmonicultura, destacando el sobreconsumo de antibióticos; sindicado como un factor determinante de las altas tasas de mortalidad por la emergencia de enfermedades infecciosas y, el desmedro nutricional que ha resultado del reemplazo de proteína animal por proteína de origen vegetal en la alimentación de los salmónidos de producción, es que la suplementación nutricional con distintos compuestos, incluyendo minerales como el selenio (Se) es necesaria para la mantención de estándares sanitarios y productivos en peces de cultivo [28].

El Se es considerado un nutriente esencial para múltiples especies de peces incluyendo a los salmónidos [29-31] dado que interviene en variados procesos metabólicos destacando aquellos dirigidos a un adecuado estado inmunológico [32] y oxidativo [33]. Según Kaufmann *et al.* [34], el uso del Se podría ser una alternativa terapéutica dirigida a modular mecanismos del hospedero que limiten la proliferación y persistencia de patógenos en el organismo.

Recientemente, los avances en nanotecnología han permitido la producción de nanopartículas (Nps) de Se ( $Se^0Nps$ ) con alta bioactividad dada sus propiedades fisicoquímicas como su alta estabilidad, hidrofobicidad y una amplia área de contacto [35]. El tamaño de las Nps y su hidrofobicidad afecta su inclusión citoplasmática, siendo la tasa de acumulación en el citoplasma de células estomacales e intestinales, inversamente proporcional a su tamaño y proporcional a la hidrofobicidad. Esta última característica, se relaciona con la interacción de las Nps con las membranas celulares [36, 37].

Los métodos de producción de Nps pueden ser divididos en físicos, químicos y biológicos, los últimos también conocidos como “síntesis verde” de Nps [38, 39]. Los métodos químicos tienen el inconveniente de que para su implementación es necesario el uso de

múltiples compuestos químicos, muchos de los cuales, han demostrado ser altamente tóxicos implicando el riesgo de intoxicación por parte de los operadores [40] y de contaminación ambiental [41].

La llamada síntesis verde ofrece un enfoque ecológico de producción de Nps puesto que recurre a entidades biológicas, unicelulares o multicelulares simples como bacterias, hongos, levaduras, algas y tejidos vegetales que, por contener agentes reductores y estabilizadores son capaces de transformar compuestos y a partir de estos, sintetizar partículas [42].

El uso de las Se<sup>0</sup>Nps en la nutrición animal ha sido explorado con resultados promisorios en ovejas [43, 44], pollos broilers [45, 46] y peces [47, 48] en los que se ha reportado el mejoramiento del estado oxidativo, de respuesta inmune y de parámetros de crecimiento y/o ganancia de peso.

Considerando la necesidad por incluir innovaciones en el proceso productivo por parte de la industria salmonicultora nacional dirigidas a i) disminuir el efecto ambiental deletéreo causado directamente por el desarrollo de esta importante actividad económica para nuestro país, destacando el uso inadecuado de agentes antibióticos, ii) mejorar la capacidad de respuesta orgánica de los peces frente a las enfermedades comunes y emergentes y iii) al menos mantener las actuales tasas de crecimiento considerando la serie de desventajas que trae la inclusión de materia prima de origen vegetal en la formulación del alimento, es que vemos en el uso de las Se<sup>0</sup>Nps biogénicas como un suplemento nutricional con potencialidad de ser constituido como una alternativa productivamente interesante de implementar.

En el Laboratorio de Microbiología Ambiental (LMA) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción (UdeC), hemos logrado la síntesis verde de Se<sup>0</sup>Nps por parte de las bacterias *Pantoea agglomerans* UC-32 y ácido lácticas (LAB), por lo que se ha generado conocimiento que permite proyectar la profundización del estudio de las Se<sup>0</sup>Nps para su aplicación en distintas áreas productivas, como es el caso del presente trabajo, en la trucha arcoíris.

Como insumos para la génesis de la presente tesis fueron considerados los siguientes cuestionamientos:

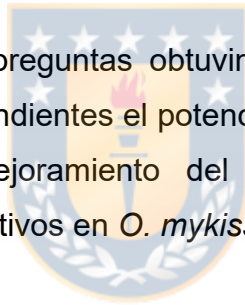
1. La administración de Se<sup>0</sup>Nps biosintetizadas por *Pantoea agglomerans* y funcionalizadas con L-cisteína (L-Cys) (Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys) como suplemento dietético para la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo:

¿mejorará índices de estado oxidativo, de respuesta inmune innata y productivos en comparación con la administración de selenito de sodio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) como suplemento dietético?

2. La administración de LAB con potencialidad probiótica y productoras de Se<sup>0</sup>Nps (LAB-Se<sup>0</sup>Nps) como suplemento dietético para la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo:

¿mejorará índices de estado oxidativo, de respuesta inmune innata y productivos en comparación con la administración de la misma bacteria no enriquecida con Se<sup>0</sup> como suplemento dietético?

Para dar respuesta a estas preguntas obtuvimos Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys y LAB-Se<sup>0</sup>Nps y evaluamos mediante ensayos independientes el potencial biotecnológico de cada una como suplemento nutricional para el mejoramiento del estado oxidativo, del desempeño inmunológico y de parámetros productivos en *O. mykiss*.



## **ANTECEDENTES GENERALES**

### **1. Aspectos generales del tracto intestinal de peces salmónidos**

En su entorno natural, los peces salmónidos son carnívoros con un ciclo de vida que incluye un período previo a la esmoltificación en los ríos, seguido de la migración al mar y el posterior regreso al río para desovar. Esta vida libre contrasta marcadamente con las condiciones de vida de los peces de cultivo en un entorno confinado y cuya dieta es igualmente muy diferente [49].

Las condiciones de cultivo alteran la integridad intestinal de los peces salmónidos al estar constantemente enfrentados a mayores cargas de microorganismos que los peces silvestres [49]. Los métodos de cultivo de peces que se centran en disminuir la carga de patógenos ambientales a través de la administración de agentes antimicrobianos, pueden generar un efecto deletéreo sobre los microorganismos comensales no patógenos ubicuos en el intestino de los peces, incidiendo en presentaciones inflamatorias del tracto entérico que afectan la disponibilidad de los nutrientes y la composición y funcionalidad de la microbiota residente [50-54].

La salud intestinal es un problema importante en todas las producciones animales no solo porque se relaciona con éxitos productivos, sino que también porque afecta el bienestar animal [55]. Desde esta perspectiva, y según lo indicado en la circular N° 1189 relativo al bienestar de los peces en cultivo de la FAO (2019), la inclusión injustificada de situaciones que incidan negativamente en el bienestar animal debe ser resuelta con las respectivas medidas compensatorias dirigidas a la recuperación de un estado óptimo del bienestar, lo antes posible [56].

La presentación de eventos inflamatorios intestinales en los peces de cultivo es difícilmente pesquisable clínicamente dada la complejidad que implica la observación de cambios en el aspecto del material fecal, como es posible de realizar en los animales terrestres. El método más utilizado para diagnosticar alteraciones intestinales en peces de cultivo implica la examinación histológica de secciones del intestino de una muestra de la población [57].

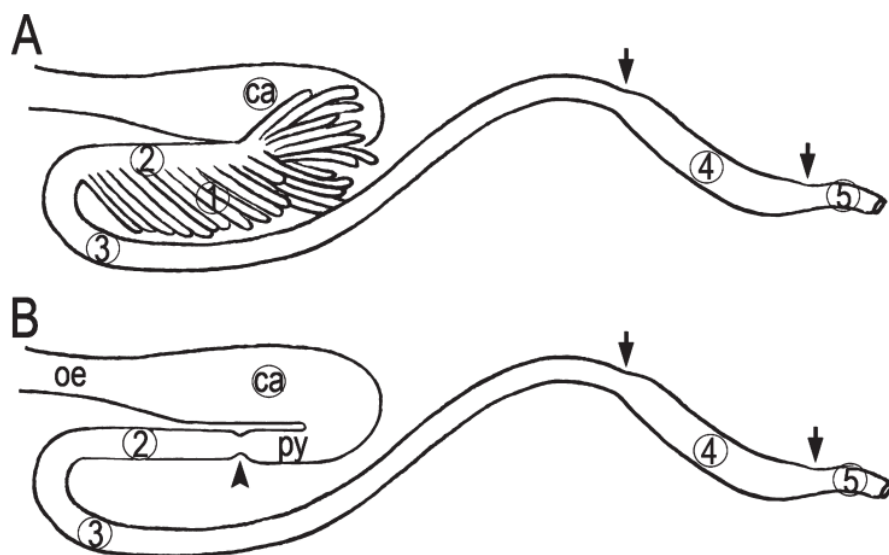


## 1.1. Morfología macroscópica del intestino

En todos los vertebrados, el tubo digestivo se forma a partir de una secuencia de eventos embriológicamente similar [58]. En el recorrido del tubo digestivo, es posible observar diferencias topográficas, tanto internas como externas, consecuentes con las distintas funciones de cada segmento. Desde la apertura bucal, este canal se divide en la cavidad bucal, la faringe, el esófago, el estómago, el intestino y el ano [57].

A partir de estudios anatómicos realizados en el pez cebra (*Danio rerio*), Wallace *et al.* [59] propusieron una nomenclatura que divide el intestino en tres segmentos; intestino anterior, medio y posterior. El intestino anterior comprende el esófago y el estómago. El intestino medio se divide, a su vez, en un segmento craneal y otro caudal. El segmento caudal presenta características estructurales semejantes al íleon de los mamíferos. Finalmente, el intestino posterior es menos extenso en peces y comparte ciertas características morfológicas que lo harían semejante al colon de los mamíferos [59, 60].

Con base en esta nomenclatura, Løkka *et al.* [61] abordaron la anatomía del tracto gastrointestinal del salmón. Estos autores propusieron modificaciones a la nomenclatura anteriormente señalada, ofreciendo una descripción detallada de la anatomía intestinal de peces salmónidos (Figura 1). Desde la porción pilórica del estómago hacia caudal, este sistema fue dividido en la porción anterior del primer segmento del intestino medio (con aberturas en los ciegos pilóricos); la porción posterior del primer segmento del intestino medio que se encuentra caudal a las aberturas de los ciegos pilóricos; el segundo segmento del intestino medio y finalmente el segmento posterior corto. Este segmento se correspondería con el colon de los mamíferos [57].



**Figura 1.** Dibujo esquemático del tracto gastrointestinal de un pez salmónido. **A.** Esquema que incluye ciegos pilóricos. **B.** Esquema que no incluye ciegos pilóricos. (ca) zona del cardias (estómago), (1) ciegos pilóricos, (2) porción anterior del primer segmento del intestino medio con ciegos pilóricos, (3) porción posterior del primer segmento del intestino medio, caudal a los ciegos pilóricos, (4) segundo segmento del intestino medio (límites indicados con flechas) y (5) segmento posterior corto del intestino. (oe) esófago, (py) porción pilórica del estómago, (cabeza de flecha) esfínter pilórico indicado en **B.** Esquema obtenido de Løkka *et al.* [61].

Estudios que han evaluado la expresión de genes involucrados en la respuesta inmunológica del tracto gastrointestinal de salmónidos revelaron que el segundo segmento del intestino medio es inmunológicamente más activo que los otros segmentos [62-65]. Esta mayor actividad inmunológica explicaría la mayor intensidad de la respuesta inflamatoria en este segmento intestinal en comparación con los otros segmentos en salmónidos alimentados con piensos que incluyen como fuente de proteínas, la harina de soya [66, 67].

El segundo segmento del intestino medio ha sido considerado como el símil del íleon de los mamíferos, el que es rico en células inmunitarias y posee tejido linfoide asociado, organizados en las placas de Peyer. A este nivel, es posible observar cúmulos de linfocitos B rodeadas de linfocitos T. Hacia la luz intestinal, las placas de Peyer están cubiertas por células epiteliales especializadas en la captación de antígenos luminales denominadas células M, las que carecen de un recubrimiento de glicocálix y presentan pliegues en lugar de los microvilli característicos del resto de los enterocitos. De acuerdo con Fuglem *et al.* [68], se han identificado células con algunas funciones similares a las células M en el segundo

segmento del intestino medio de los salmónidos, hallazgo que apoya la suposición de que el segundo segmento del intestino medio corresponde al íleon de los mamíferos.

## 1.2. Morfología microscópica y generalidades funcionales del intestino

La superficie luminal del epitelio intestinal está cubierta por una capa de glicocálix que tiene como función principal prevenir la entrada de bacterias y otros microorganismos a las células epiteliales o al tejido conectivo [69]. Según lo informado por Jin *et al.* [70], son escasos los estudios relativos al glicocálix intestinal en los peces, situación distinta respecto del glicocálix y sus funciones en branquias [71]. En general, el glicocálix presenta una cobertura de mucina que se forma por la actividad de las células productoras de moco como las células caliciformes [70]. La estructura conformada por el moco y el glicocálix constituye una barrera importante y selectiva entre los enterocitos y el contenido intestinal [72].

La capa de moco es rica en moléculas inmunológicamente activas, como proteínas del complemento, lisozima, proteasas, péptidos antimicrobianos e inmunoglobulinas [73] que son importantes para combatir a agentes patógenos y mantener la tolerancia a los microbios comensales. Un estudio reciente en la trucha arcoíris mostró que la inmunoglobulina T (IgT) secretora presente en la superficie de la mucosa branquial es funcionalmente análoga a la IgA de los mamíferos en términos de eliminación de patógenos y hemostasia de la microbiota residente [74].

A diferencia de los peces, el epitelio intestinal de los mamíferos forma criptas (criptas de Lieberkühn) y vellosidades en el intestino delgado y criptas, pero no vellosidades, en el colon, que es parte del intestino grueso. La proliferación de células epiteliales ocurre en las criptas de Lieberkühn y, desde este lugar donde es posible encontrar células madre, se produce la proliferación y diferenciación continua de los principales fenotipos celulares constituyentes del epitelio intestinal; células columnares, células enteroendocrinas, células caliciformes y células de Paneth [75].

En los salmónidos, no se han identificado criptas [61]; únicamente en el intestino del pez lobo común (*Anarhichas lupus* L.) han sido identificadas estructuras similares [76]. Las regiones de células madre, definidas como áreas de proliferación epitelial en el intestino de los salmónidos, se encuentran en la base de los pliegues intestinales primarios y secundarios [61]. Las células columnares son las más abundantes y las células caliciformes pueden

identificarse mediante tinción de PAS [61]. Igualmente, se han identificado células enteroendocrinas en el intestino de peces teleósteos, incluyendo los salmónidos [77].

Las células de Paneth (llamadas así por el fisiólogo vienés Joseph Paneth) están presentes en varias especies, pero no se han informado en los peces. Paneth, en 1888 identificó estas células en la base de las criptas de Lieberkühn e inicialmente las denominó "Körnchenzellen" o "células con gránulos pequeños". Estas células producen defensinas que tendrían el rol de mantener las criptas de Lieberkühn libre de gérmenes, protegiendo así la región donde se producen las células progenitoras del epitelio intestinal [57].

Estudios de transcriptómica en células intestinales de peces salmónidos dan cuenta de la expresión de genes para la síntesis de  $\beta$ -defensinas no así, de  $\alpha$ -defensinas [78]. En los mamíferos, algunos tipos celulares epiteliales del intestino pueden producir  $\beta$ -defensinas, sin embargo, las células de Paneth producen  $\alpha$ -defensinas. Bjørge *et al.* [57], señalan que podría haber células intestinales de peces salmónidos con función similar a las células de Paneth. Estos autores agregan que el descubrir este tipo de células en vertebrados inferiores ayudaría a comprender muchos procesos inmunológicos intestinales que, en la actualidad, son pobremente entendidos.

Como en los mamíferos, en los peces teleósteos los enterocitos son células polarizadas adheridas a la membrana basal que conforman vellosidades con proyección hacia la luz intestinal, mediante la superposición celular [68]. Se cree que, como mecanismo compensatorio, los enterocitos podrían adoptar funciones correspondientes a otros tipos celulares, tal como fuera sugerido por Flugem *et al.* [68] quienes describieron la capacidad de enterocitos de salmónidos de adoptar funcionalidad celular atribuible a células M. Se han identificado células con ciertas propiedades de células M en salmónidos [68], pero a diferencia de las células M de mamíferos, estas poseen microvellosidades y no se ha demostrado que sean capaces captar antígenos luminales del tamaño de bacterias o levaduras [65].

En los mamíferos, los enterocitos dispuestos a lo largo del intestino captan, transportan y procesan antígenos solubles derivados de alimentos y microbios mediante pinocitosis [79, 80]. Además, la expresión de receptores de inmunoglobulina en la superficie del enterocito facilita el transporte bidireccional de complejos Ig-antígeno [80, 81]. La captación y posterior

endocitosis de material particulado por parte de los enterocitos de los vertebrados superiores se lleva a cabo principalmente a través de la interacción del material exógeno con receptores de membrana citoplasmática [82]. Las partículas sólidas cuyos tamaños superan los 0,5 µm pueden ser incluidas en vesículas luego de tomar contacto con la membrana citoplasmática de los enterocitos y ser integradas al citoplasma constituyendo el fagosoma en un proceso llamado fagocitosis [83, 84].

En los peces teleósteos, al igual que en los mamíferos, se han descrito varios mecanismos de captación de antígenos que involucran diferentes tipos de células. Condiciones patológicas tales como lesiones e inflamación, además de modificadores de la mucosa, pueden afectar las capacidades de absorción transcelular [85, 86].

Estudios que han abordado la captación de antígenos bacterianos en el intestino de peces teleósteos, han sugerido la reactividad de los enterocitos al tomar contacto con estructuras antigénicas bacterianas [87-92]. Tras la captación de componentes bacterianos por parte de los enterocitos de algunas especies de peces teleósteos, estos pueden ser procesados para que luego de la exocitosis sean fagocitados por macrófagos intra o subepiteliales o bien para ser presentados como antígenos. En un reporte de Joosten *et al.* [89], se indicó que los enterocitos de la carpa y la trucha arcoíris, únicamente endocitan fracciones bacterianas de *Vibrio sp* inactivado, no bacterias enteras. Sin embargo, en otras especies de teleósteos, se observó endocitosis de bacterias completas por parte de los enterocitos [84, 93-95].

Los enterocitos intestinales en ratones adultos pueden captar e integrar al citoplasma, Nps inertes de aproximadamente 40 nm [96]. La mayor parte del material captado por los enterocitos se degrada dentro de las células [97, 98] pero también es necesario el paso transepitelial de pequeñas cantidades de macromoléculas para estimular la tolerancia inmunitaria a los antígenos y componentes de la dieta [80]. Además, los enterocitos de mamíferos y teleósteos pueden expresar moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II que indican la presentación de antígenos [99, 100]. Los enterocitos están en estrecho contacto con los macrófagos y linfocitos T en posiciones intraepiteliales y subepiteliales y se cree que tienen injerencia en la presentación de antígenos y en la regulación de las respuestas de los linfocitos T de la mucosa [82].

Se han descrito diferentes mecanismos para el transporte de antígenos y otros compuestos, como nutrientes, a través de la membrana de los enterocitos. Dichos mecanismos varían en función del tamaño y la naturaleza química de las estructuras integradas. En la carpa (*Cyprinus carpio*) y la trucha arcoíris, la ferritina es integrada al citoplasma de los enterocitos por pinocitosis [101-103], mientras que la peroxidasa de rábano (PRP) es detectada en el citoplasma tras su adhesión a la superficie de la membrana apical [101].

En células intestinales de la carpa, se detectó la presencia de sitios de unión específicos a PRP ubicados principalmente en la membrana del borde en cepillo de los enterocitos, a través de la pesquisa de la PRP conjugada con la proteína de fluorescencia GFP (green fluorescent protein) unida a proteínas de superficie de los enterocitos con características estructurales atribuibles a receptores [104]. Utilizando una metodología similar, Companjen *et al.* [105] demostraron que los enterocitos de carpa fueron capaces de endocitar la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB), luego de que LBT se unió a receptores de membrana.

Al usar la ferritina para evaluar el método de captación por parte de los enterocitos de *S. salar* y *O. mykiss*, Urán *et al.* [106] y Georgopoulou *et al.* [107], respectivamente, comprobaron que la ferritina se internalizó en el citoplasma de enterocitos de la porción posterior del intestino medio y que luego fue exocitada y fagocitada por macrófagos intraepiteliales. Otras investigaciones igualmente indicaron que la PRP fue endocitada por enterocitos y luego liberada al espacio intercelular del epitelio donde igualmente fue fagocitada por macrófagos intraepiteliales [101, 108, 109].

En general, para todos los segmentos intestinales, la lámina propia se encuentra debajo del epitelio intestinal y es conformado por tejido conectivo y leucocitos. A esta capa le sigue, hacia parietal, un estrato de mayor densidad y espesor de tejido conectivo llamado estrato compacto que, a su vez, es rodeado por el estrato granuloso rico en mastocitos. Sobre el estrato granuloso, se asientan fibras musculares lisas que se orientan transversalmente. El complejo muscular intestinal se compone de fibras de disposición interna y orientación circular y de disposición externa y orientación longitudinal recorriendo toda la extensión del intestino.

Hay algunas variaciones menores en cuanto a composición y funcionalidad tisular intestinal entre especies [61, 110]. Por ejemplo, en la lámina propia del intestino del salmón, se pueden encontrar células positivas para IgM, células T, células presentadoras de antígenos y mastocitos [65, 67] difiriendo de los descrito para esta lámina en otros peces teleósteos [110].

En mamíferos, se ha demostrado que moléculas pequeñas y sondas experimentales inertes (0,5 - 1 nm) acceden a la lámina propia intestinal a través de las uniones estrechas [80]. Las lesiones e inflamación en la mucosa intestinal afectan la permeabilidad de las uniones celulares estrechas en vertebrados superiores [111]. Sin embargo, para peces teleósteos, aún no se cuenta con la evidencia que permita establecer una relación entre el nivel de alteración en la absorción y biodisponibilidad de nutrientes y el nivel de daño o modificación de la unión intercelular puesto que no ha sido demostrado el transporte de antígenos o sustancias de valor nutricional a través de estas estructuras de unión [57].

### **1.3. Digestión y absorción de nutrientes en peces**

Después de los procesos digestivos en el estómago, donde el alimento ingerido toma contacto con fluidos ácidos y es denominado quimo, este pasa al intestino mezclándose con secreciones del páncreas exocrino que contienen bicarbonato y enzimas digestivas. Como resultado, el pH aumenta de aproximadamente 3,8 en el estómago a cerca de 8 en el primer segmento del intestino medio en el salmón [57].

Las enzimas digestivas descomponen los nutrientes complejos formando estructuras más pequeñas susceptibles de ser absorbidas a través del epitelio intestinal. Muchas enzimas digestivas, en particular las proteolíticas, se sintetizan y almacenan en formas inactivas como proenzimas o zimógenos. La activación de estas proteínas se lleva a cabo en el lumen intestinal por acción de enzimas como la enteroquinasa que cataliza la activación de la tripsina [112, 113]. Dentro de las enzimas digestivas comunes entre vertebrados se cuenta con proteasas (tripsina, quimotripsina, elastasa, colagenasa, amino- y carboxi-peptidasas), lipasas, fosfolipasas, ribo- y desoxirribonucleasas y amilasas [58].

El salmón del Atlántico presenta una actividad reducida de la amilasa pancreática intestinal, en comparación con dicha actividad en peces omnívoros o herbívoros [114, 115]. La amilasa pancreática cataliza la hidrólisis de carbohidratos como el almidón por lo que su

actividad es importante en la medida que, como constituyente de la dieta del pez se integre materia vegetal [115]. La necesidad de inclusión de ingredientes de origen vegetal en la dieta de los peces salmónidos, dada la escasez y alto valor económico de la harina y aceite de peces marinos, se ve limitada por la baja actividad de la amilasa pancreática intestinal, determinando que la industria productora de alimentos para la salmonicultura no pueda actualmente incluir más de un 10% de carbohidratos en la dieta [116].

Además de las secreciones pancreáticas, el quimo se mezcla con la bilis proveniente de la vesícula biliar que ingresa al tracto digestivo a través del colédoco, de ubicación caudal al esfínter pilórico [117]. En el caso de la trucha arcoíris, hasta el 25% del quimo, en base a materia seca, podría estar constituido por bilis en las proximidades del esfínter pilórico [118-122]. La concentración de sales biliares disminuye gradualmente a lo largo del recorrido intestinal, lo que indica su reabsorción y reciclaje mediante mecanismos aún desconocidos [119].

De acuerdo con Grenn & Nasset [123], los ácidos biliares actúan como detergentes que favorecen la emulsión de lípidos, vitaminas liposolubles y otros componentes apolares de la dieta. Tras la emulsión, los lípidos pueden ser hidrolizados mediante la acción de distintas lipasas. Las sales biliares también estabilizan proteínas y enzimas digestivas y, por lo tanto, cumplen un rol de protección al evitar la autodigestión o daño del tejido intestinal por acción de las secreciones digestivas.

Los enterocitos tienen funciones digestivas y de absorción y, como tales, son de vital importancia para el correcto funcionamiento del sistema digestivo. La naturaleza plegada del borde en cepillo aumenta en gran medida la superficie de contacto y, por lo tanto, la capacidad de absorción de sustancias. Las membranas celulares de las microvellosidades contienen importantes enzimas digestivas como aminopeptidasas, maltasa, sacarasa, fosfatasa alcalina y lipasas. Las enzimas digestivas concentradas en el borde en cepillo son las encargadas de la digestión final de los nutrientes ya dispuestos en fragmentos pequeños. La absorción de nutrientes por parte de los enterocitos puede ocurrir por pinocitosis, difusión simple, intercambio iónico o transporte activo por transportadores de proteínas [124].

En el primer segmento del intestino medio de salmónidos, que incluye a los ciegos pilóricos, se lleva a cabo cerca del 70 % de la acción secretora y de absorción de nutrientes



de todo el intestino [125, 126]. Dado que casi toda la extensión del intestino del salmón tiene borde en cepillo la inclusión de nutrientes en el citoplasma de los enterocitos puede llevarse a cabo prácticamente en todo el órgano. En situaciones en las que la capacidad de absorción de la región proximal del intestino es disminuida o excedida, podría ser compensada por los segmentos intestinales de ubicación caudal al primer segmento del intestino medio [125].

De esta forma los nutrientes de la dieta, que incluyen proteínas, polipéptidos, aminoácidos, lípidos, carbohidratos, vitaminas, pigmentos carotenoides y minerales son transportados o absorbidos desde la luz intestinal hacia la circulación sistémica [54].

## **2. Nutrición mineral en peces**

Todos los animales acuáticos requieren de minerales para llevar a cabo funciones fisiológicas y bioquímicas vitales y necesarias para completar su ciclo natural. Los salmónidos poseen la plasticidad osmorregulatoria que les permite ocupar columnas de agua con concentraciones de minerales significativamente distintas, como sucede con salmones y truchas que deambulan entre el mar adentro y zonas estuarinas [28]. A diferencia de otros vertebrados, los peces captan minerales desde la dieta y el medio líquido circundante [28].

La mayoría de los minerales esenciales necesarios para los vertebrados terrestres [127], también han sido detectado en tejidos y procesos metabólicos de los peces [128]. Dentro de los minerales considerados esenciales para los peces se encuentra aquellos clasificados como macrominerales: calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg), sodio (Na), potasio (K) y cloro (Cl)) y como microminerales, también conocidos como oligoelementos: cobalto (Co), cobre (Cu), yodo (I), hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn) y el selenio (Se) [129, 130].

A nivel celular, los mecanismos bioquímicos de metabolización de minerales en los peces generalmente son considerados similares a los descritos en los animales terrestres. Sin embargo, la determinación de los requerimientos nutricionales de minerales representa un desafío en el proceso de formulación dietaria dado que, a diferencia de los animales terrestres, en los peces se presentan otras vías de intercambio de iones como las branquias y la piel [128].

El extenso entramado vascular de las branquias permite que éstas lleguen a representar más del 50% de superficie de contacto del individuo con el medio acuático, pudiendo ser más importante la absorción de minerales por esta vía que por la vía digestiva en agua dulce. No obstante, si la concentración de minerales o de algún mineral es reducido en el agua, el sistema digestivo compensará constituyéndose como la principal vía de absorción, a partir del alimento ingerido [28].

En agua de mar, la absorción de minerales desde el alimento es preponderante en comparación con la absorción mineral desde branquias y piel como resultado de una sobreexpresión de procesos osmorregulatorios intestinales que permiten una mayor tasa de absorción de agua y solutos desde el sistema digestivo [131].

Como se ha mencionado, el alimento para salmónidos es formulado con cantidades crecientes de ingredientes de origen vegetal. Por esto, es que se realizan evaluaciones constantes a los efectos que las modificaciones en la formulación dietaria producen en la absorción de distintos nutrientes, incluyendo los minerales, puesto que la composición del alimento puede modificar el ambiente estomacal e intestinal, influyendo en la tasa de absorción [128]. Además, la absorción intestinal de minerales desde el alimento podría variar dependiendo de la concentración de otros minerales constitutivos del quimo puesto que su interacción podría determinar la formación de complejos no absorbibles por el epitelio intestinal [128].

Dada la tendencia natural de los minerales para establecer enlaces químicos con otros minerales, es esperable que se establezca interacción entre estos y lleve a la formación de complejos con diferentes actividades biológicas [28]. El término "interacción" para minerales, en un contexto nutricional, fue definido por O'Dell [132] como "relaciones químicas entre elementos minerales que determinan consecuencias fisiológicas o bioquímicas en el individuo en el cual se llevan a cabo". Este autor continúa clasificando estas interacciones como positivas o sinérgicas, o negativas o antagónicas.

Como ejemplos de interacciones positivas entre minerales, se cuenta la formación de hemoglobina dada la constitución de enlaces entre el Cu y el Fe, la estructuración de hidroxiapatita como componente del tejido óseo luego de la interacción entre Ca, P y Mg y la

adquisición de una conformación espacial biológicamente adecuada de moléculas de RNA en hepatocitos dada la interacción de Mn con Zn, entre otros [132].

En cuanto a interacciones negativas o antagónicas éstas ocurren, por ejemplo, cuando los elementos con una configuración electrónica y un radio iónico similar compiten por sitios de unión, como el cadmio (Cd) que se une a la metalotioneína a través de grupos tiol (-SH) en desmedro de la unión Zn-metalotioneína, disminuyendo así, su actividad biológica. El Zn como elemento constitutivo de la metalotioneína permite que esta metalo-proteína tenga entre otros roles fisiológicos la homeostasis del Zn y el Cu y la defensa antioxidante [132].

Otro ejemplo de interacción negativa es la formación a nivel intestinal, de un complejo insoluble entre el Cu y el S para formar sulfuro de cobre, compuesto que además puede interactuar con Zn y favorecer la formación de sustancias antinutricionales como el ácido fítico, a partir de fitatos, presentes en ingredientes dietarios de origen vegetal [133]. Por su parte Hilton [134], ha informado una serie de posibles interacciones mineral-mineral y mineral-vitamina en el intestino de peces.

Una investigación realizada en animales ha demostrado que los requerimientos de minerales se ven afectados significativamente por su biodisponibilidad a partir de diferentes formas de suplementos e ingredientes alimenticios. La biodisponibilidad de un nutriente se define como la proporción de un elemento o compuesto que, incluido en la dieta, es absorbido por los enterocitos y alcanza la circulación sanguínea quedando disponible para su procesamiento, y luego uso, o integración directa en procesos fisiológicos [132].

Según Ammerman [135] es necesario desarrollar investigaciones que ayuden a comprender los efectos de las distintas interacciones mineral-mineral y mineral-otros compuestos en el metabolismo animal. Conocer más acerca del metabolismo mineral mejoraría la formulación de las raciones, favorecería el logro de objetivos productivos, favorecería la mejor utilización de los recursos e impactaría positivamente en el bienestar animal [135].

De acuerdo con Lall & Kaushiok [28], el conocimiento disponible acerca del metabolismo de los elementos traza o microminerales en peces es muy limitado. Los estudios acerca de la biodisponibilidad de los microminerales han facilitado la caracterización de algunos efectos de la inclusión dietaria de oligoelementos sobre la absorción aparente o

digestibilidad de nutrientes, la tasa de desarrollo y ganancia de peso, la concentración de minerales en plasma o tejidos, la actividad enzimática específica (por ejemplo, superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (Gpx)) o parámetro sanguíneo (por ejemplo, nivel de hemoglobina) y la determinación de efectos bioquímicos y clínicos ligados a la deficiencia o exceso de un mineral en el organismo [132, 134, 135]. Algunos de los métodos utilizados en peces para estimar la biodisponibilidad de Zn, Fe y Se consideran el uso de dietas prácticas o químicamente definidas formuladas a partir de ingredientes de origen animal, vegetal o mixtos [28].

Los animales acuáticos pueden acumular minerales en sus tejidos obtenidos de diferentes fuentes, como el agua y el alimento. Tanto las deficiencias como la acumulación excesiva de minerales en los tejidos podrían causar alteraciones fisiológicas [136-138]. Según Janz [139] y Janz *et al.* [140], el Se, aunque esté dispuesto abundantemente en el medio acuático, la vía de absorción preponderante es la digestiva, por lo que los salmónidos silvestres o asilvestrados obtienen el Se esencialmente desde los peces y crustáceos que constituyen su dieta, o como suplemento nutricional en el caso de los salmónidos de cultivo.



### 3. El Selenio

#### 3.1. El Se en el ambiente

Es un elemento químico no metálico del grupo 16 y periodo 4 de la tabla periódica. Se presenta en diferentes estructuras polimórficas. Existen tres alótropos de Se: el Se gris, la forma más estable a temperatura ambiente, el Se negro amorfo con una estructura compleja compuesta por cerca de mil átomos de Se y el Se cristalino monocíclico rojo que se obtiene de reacciones de reducción de selenitos y seleniatos [141].

En la naturaleza, el Se está ampliamente distribuido en rocas y suelos donde se encuentra formando una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos (Tabla 1). La mayoría de sus especies orgánicas contienen Se en estado (-2), y en las especies inorgánicas selenito y seleniato ( $\text{SeO}_3$  y  $\text{SeO}_4$ ), se encuentran estados de oxidación más altos [141].

Tanto los seleniuros de metales pesados, como el selenio elemental ( $\text{Se}^0$ ), se caracterizan por ser insolubles en agua. Por el contrario, los  $\text{SeO}_3$  y  $\text{SeO}_4$  son solubles en agua, característica que podría favorecer su biodisponibilidad. Dentro de los factores que afectan la biodisponibilidad del Se y sus formas, está el pH, el potencial redox y la presencia de óxidos metálicos [142].

**Tabla 1.** Compuestos de selenio de importancia biológica [141, 142].

Compuestos inorgánicos		Compuestos orgánicos	
Forma química	Denominación	Forma química	Denominación
$\text{Se}^0$	Se elemental	$\text{CH}_3\text{-Se-CH}_3$	dimetilseleniuro
$\text{SeO}_2$	dióxido de Se	$\text{CH}_3\text{-Se-Se-CH}_3$	dimetildiseleniuro
$\text{SeO}_3$	ión selenito	$(\text{CH}_3)_3\text{Se}$	ión trimetilselenol
$\text{SeO}_4^{2-}$	ión selenato	$\text{CH}_3\text{-Se-H}$	metilselenol

El Se fue descubierto en 1817 por el químico sueco Jöns Jacob Berzelius mientras analizaba impurezas generadas en el proceso de producción de ácido sulfúrico a partir de piritas de cobre. Desde entonces, este elemento ha sido considerado un elemento altamente tóxico y contaminante. Fue en 1957, cuando el científico alemán Klaus Schwarz, informó por primera vez sobre los beneficios del Se para la salud humana. Luego, en 1973, en la Universidad de Wisconsin fueron descubiertas las seleno-proteínas, identificando la presencia de Se en la enzima Gpx enlazado con el aminoácido cisteína constituyendo la selenocisteína (SeCys).

En 1979, en el condado de Keshan, en el noreste de China, se notificó por primera vez una enfermedad humana asociada a la deficiencia de Se, la que cursó con miocardiopatía congestiva. Esta patología fue llamada posteriormente enfermedad de Keshan puesto que, en los habitantes de este condado, fueron pesquiasada bajas concentraciones tisulares de Se. Luego y de forma similar, en Nueva Zelanda y Finlandia se reportó casos de Se deficiencia humana. La baja concentración de Se en la tierra de cultivo fue la característica común de los lugares donde se reportó los casos de deficiencia de Se [143, 144].

El Se esta diseminado en la corteza terrestre en una concentración promedio de  $0.09 \text{ mg kg}^{-1}$ . En el suelo, el Se varía en su presentación química y concentración dependiendo de la función del suelo, la conformación geoquímica, el contenido de materia orgánica y las

características pluviométricas de la zona. En general, el contenido de Se en la mayoría de los suelos oscila entre 0,1 a 0,7 mg kg<sup>-1</sup> lo que depende, en gran medida, de la intensidad de la erosión de las rocas sedimentarias y lutitas formadas durante el período cretácico. Los suelos que presentan rocas volcánicas, areniscas, granitos y calizas presentan concentraciones de Se menores; estos suelos se encuentran en los países montañosos del norte de Europa, como Finlandia, Suecia y Escocia. Por su parte, los suelos alcalinos presentan una mayor concentración de Se que los suelos ácidos. En los alcalinos, el SeO<sub>3</sub> se oxida y se convierte en SeO<sub>4</sub> soluble, el que puede ser asimilado por plantas. Por el contrario, en los suelos ácidos, el SeO<sub>3</sub> forma complejos insolubles con hidróxido de hierro y por tanto se encontrará como un compuesto poco disponible para los organismos [145].

El Se igualmente puede ser encontrado en el suelo como Se<sup>0</sup>, como sales de SeO<sub>4</sub> y SeO<sub>3</sub> férrico o en su forma orgánica. En la mayoría de los suelos es común encontrar SeO<sub>3</sub> y SeO<sub>4</sub>, ya que estas formas aniónicas son altamente solubles, móviles, biodisponibles y, por ende, potencialmente tóxicas. Las formas orgánicas proceden principalmente de la descomposición de plantas acumuladoras de Se [146].

Los niveles de Se en las plantas dependen de la concentración de Se en el suelo. El SeO<sub>3</sub> y SeO<sub>4</sub> son absorbidos desde el suelo por las raíces y luego se distribuyen por las estructuras vegetales. En la mayoría de los casos, la concentración de Se es mayor en los tejidos aéreos donde se lleva a cabo el proceso de biotransformación a formas orgánicas de Se. La mayoría de las plantas contienen concentraciones bajas de Se, incluso si se cultivan en suelos con alto contenido de dicho elemento. A estas plantas se les denomina plantas no acumuladoras [145].

Sin embargo, existe un número limitado de plantas capaces de bioacumular mayores concentraciones de Se que las no acumuladoras; son las plantas seleníferas que se encuentran principalmente en regiones áridas de China y Estados Unidos, que presentan una mayor capacidad de acumulación de Se llegando a almacenar hasta 20.000 ppm. Algunas especies de plantas acumuladoras de Se pertenecen a los géneros *Astragalus sp* que puede acumular varios miles de ppm de Se, *Machaeranthera spp* y *Oonopsis sp* capaces de contener hasta 800 ppm de Se y *Stanleya sp* y *Haplopappus sp* que pueden llegar a almacenar 700 y 120 ppm de Se, respectivamente [145].

El Se que se encuentra en el agua se origina a partir de depósitos atmosféricos o del drenaje del suelo y subsuelos que son naturalmente ricos en este micromineral. El agua potable de la Región Metropolitana, en Chile, posee baja concentración de Se en comparación con estándares internacionales [147]. En aguas superficiales predominan el seleniuro y el selenato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ). En el agua dulce, el Se está presente principalmente como  $\text{SeO}_3$  y  $\text{SeO}_4$ . Las altas concentraciones de Se en el agua podrían tener como origen fuentes naturales o antropogénicas (suplementación de tierras agrícolas con fertilizantes que contienen Se) [145].

El contenido de Se en el aire ambiente es generalmente bajo, oscila entre 1 a 10  $\text{ng m}^{-3}$ . Su presencia en el aire está relacionada con actividades naturales como la erosión del suelo, la actividad volcánica y los incendios forestales y con actividades humanas, destacando la combustión de hidrocarburos fósiles y la incineración de basura, incluyendo neumáticos y papel. La combustión de carbón y petróleo son las principales fuentes de emisiones de compuestos de Se en el aire a nivel mundial [145].

Podemos distinguir en la atmósfera los siguientes compuestos de Se: orgánicos volátiles (dimetilseleniuro), compuestos inorgánicos volátiles ( $\text{SeO}_2$ ) y  $\text{Se}^0$ , unidos a cenizas o partículas. El dimetilseleniuro es un compuesto estable, mientras que el  $\text{SeO}_2$  es inestable en el aire [148].

### **3.2. Metabolismo del Se en peces**

El Se es un micronutriente esencial para los salmónidos, pudiendo ser tóxico a relativamente bajas concentraciones dependiendo de la forma química en el ambiente o alimento [149-151]. La esencialidad del Se para varias especies de peces cultivados en agua dulce y agua de mar, ha sido igualmente reportada [33, 128, 152].

En todos los sistemas biológicos, independiente de la forma química de Se que ingrese al organismo, esta será convertida en formas orgánicas más biodisponibles, principalmente como los Se-aminoácidos: SeCys y selenometionina (SeMet). A partir de estas formas orgánicas se constituirán Se-proteínas que participan en diversas funciones biológicas. El Se-aminoácido más frecuente en Se-proteínas es la SeCys [153,154]. Un estudio comparativo

de Se-proteomas en vertebrados muestra que en mamíferos se encuentran más de 45 Se-proteínas y en peces teleósteos se han reportado cerca de 38 [155].

La SeCys está presente en los vertebrados en los sitios activos de las enzimas Gpx, tiorredoxina reductasa, yodotironina deiodinasa y la selenofosfato sintetasa [153,158]. Las funciones biológicas de muchas de estas Se-proteínas actualmente son pobremente entendidas en peces [28].

Los tres grupos de Se-proteínas mejor caracterizados en los peces incluyen a la Gpx, tiorredoxina reductasa y yodotironina deiodinada. Las Gpx participan en la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el mantenimiento de la homeostasis redox celular (equilibrio prooxidante y antioxidante). La Gpx1 es la Se-proteína más abundante y es catalogada como un potente antioxidante celular. El efecto protector celular de la Gpx frente a la acción de las especies de oxígeno reactivo (ROS, del inglés reactive oxygen species) se ha relacionado con la mantención de un estado de salud adecuado y la prevención de enfermedades en humanos y animales, incluyendo a peces como la trucha arcoíris [154,156-158].

En varios organismos se han descrito ocho isoformas de la Gpx, seis de ellas son enzimas cuya estructura incluye SeCys (Gpx1, Gpx2, Gpx3, Gpx4 Gpx6 y Gpx8) por lo que son denominadas Gpx Se-dependientes, mientras que las otras dos (Gpx5 y Gpx7) integran únicamente Cys en su sitio catalítico y son también conocidas como Gpx Se-independientes. La Gpx1 o citosólica y la Gpx4 o hidropoxidasa lipídica, están ampliamente distribuidas en los tejidos y desempeñan un papel fundamental en la regulación del estado oxidativo celular [153, 159].

Pacitti *et al.* [20] clonaron los genes *Gpx1* y *Gpx4* de la trucha arcoíris y describieron 3 parálogos por cada gen; para *Gpx1*: *Gpx1a*, *Gpx1b1*, *Gpx1b2* y para *Gpx4*: *Gpx4a1*, *Gpx4a2*, *Gpx4b*, implicando que la trucha arcoíris sería actualmente el vertebrado con el mayor número de parálogos para los genes en cuestión [20]. Los autores, también evaluaron el nivel de expresión de cada parálogo mediante la cuantificación de transcritos en la línea celular derivada de tejido hepático de trucha arcoíris RTL-W1, tras ser incubada por 24 h con diferentes concentraciones (0 nM, 1 nM - 50 µM) de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> o SeCys como fuente de Se. La incubación de RTL-W1 con SeCys determinó un significativo mayor nivel de expresión de *Gpx1a*, *Gpx1b1* y *Gpx1b2* en comparación con las células co-incubadas con Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. Por



su parte, el co-cultivo de RTL-W1 con  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  implicó un mayor nivel de expresión en *Gpx4a2* y *Gpx4b* aunque la diferencia con los valores obtenidos del co-cultivo células-SeCys fue no significativa. En el mismo trabajo, los autores también evaluaron el nivel de expresión constitutiva de las 6 isoformas en la aleta caudal, la aleta adiposa, escamas, piel, cerebro, timo, branquias, la porción craneal del riñón, el bazo, sangre, corazón, ovario, hígado, esófago, estómago, ciegos pilóricos, intestino medio e intestino distal, determinando un mayor nivel de expresión de las isoformas de *Gpx4* en todos los tejidos excepto en sangre, la porción craneal del riñón y el bazo, mientras que las isoformas de *Gpx1* tuvieron un mayor nivel de expresión bajo exposición con SeCys o  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Los autores concluyeron que el nivel de expresión de *Gpx1* en la trucha arcoíris podría ser usada como un biomarcador sensible para la ingesta de Se que ayudaría a evaluar si la concentración de Se y la especiación química de este, tienen un impacto en la homeostasis celular.

La tiorredoxina reductasa es también una enzima antioxidante relevante en la mantención del estado redox celular. El Se como parte integral de *Gpx* y la tiorredoxina reductasa interactúa con algunos micronutrientes (por ejemplo,  $\alpha$ -tocoferol) que afectan el estado redox. El en tercer grupo de Se-proteínas esta la yodotironina deiodinasa, que activa la prohormona tiroxina, tetrayodotiroxina (T4) que pasa a ser llamada triyodotironina (T3). Además, esta enzima cataliza la inactivación de T3 para su reversión a T4 y de T3 a diyodotironina (T2) [153].

En los peces el tracto gastrointestinal es el sitio donde se produce la mayor absorción de Se [139, 140]. Los ecosistemas acuáticos se caracterizan por contener bajas concentraciones de Se [140]. Es probable que la SeCys y la SeMet sean absorbidas a nivel intestinal por un mecanismo de transporte activo de aminoácidos. El  $\text{SeO}_3$  y el  $\text{SeO}_4$  son incluidos en el citoplasma de los enterocitos por difusión simple y mediante un mecanismo de transporte dependiente de sodio, respectivamente [159]. El Se al ingresar a la circulación sanguínea es transportado al hígado y se metaboliza a seleniuro y se incorpora a la SeCys para ser parte de Se-proteínas o Se-azúcares o metabolitos metilados para su excreción. Los peces y otros vertebrados excretan Se a través de las heces, pero la orina es la principal vía de excreción y probablemente desempeñe un papel cuantitativamente importante en la homeostasis del Se [139,159].

Hay abundante información relacionada con los efectos beneficiosos y tóxicos de la suplementación dietaria con Se en animales, incluyendo peces [160-163]. La administración de dietas suplementadas con Se a la trucha arcoíris y el pez cebra (*Danio rerio*) incrementó el nivel de expresión de la Se-proteína P, la cual cumple funciones antioxidantes y se implicaría en la homeostasis del Se, siendo catalogada como almacenadora y transportadora de este micromineral por el organismo [164-167]. De acuerdo con Berntssen *et al.* [168], en el salmón del Atlántico los órganos que acumulan una mayor cantidad de Se son el riñón y el hígado. La retención y distribución de Se en los tejidos sería dependiente del estado de las reservas tisulares, puesto que en animales con deficiencias de Se se llevarían a cabo modificaciones metabólicas dirigidas a favorecer disminución de la tasa de pérdida del mineral a través de la orina [168].

### 3.2.1. Requerimientos

Los requerimientos de Se en algunas especies de peces han sido determinados considerando el efecto de distintas concentraciones del mineral administrado por más de una vía sobre parámetros productivos, de estado oxidativo y almacenamiento de Se en los tejidos [28]. El requerimiento mínimo de Se en los peces varía de acuerdo con la forma química del Se administrado (inorgánico u orgánico) a la eficiencia de extracción de Se desde el alimento, la capacidad de captación y absorción de Se por parte del epitelio intestinal, la concentración de vitamina E que contiene la dieta y la concentración de Se en el agua. Los requerimientos estimados de Se basados en el aumento de peso, la retención de Se en los tejidos y la actividad de la enzima Gpx en plasma, hígado y musculatura han mostrado valores diferentes entre algunas especies de peces.

El requerimiento estimado de Se para el smolt de salmón del Atlántico alimentado con piensos formulados a partir de ingredientes de origen vegetal fue ajustada a 0,27 mg Se kg<sup>-1</sup> materia seca de alimento. Para determinar el requerimiento nutricional de Se en el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), se evaluó la tasa de crecimiento y almacenamiento corporal del mineral determinándose un requerimiento dietario de 0,39 a 0,3 mg Se kg<sup>-1</sup> materia seca de alimento [169]. Para la trucha arcoíris, se ha determinado un requerimiento dietario de 0,15 a 0,38 mg Se Kg<sup>-1</sup> materia seca de alimento. En el salmón coho y la trucha arcoíris los requerimientos nutricionales se han definido únicamente a partir de estudios de metabolismo con Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> [31, 169, 150]. Dentro de las especies de salmónidos, el salmón del Atlántico

ha sido la única especie en la se ha ensayado, además de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , la SeMet como constituyente nutricional para determinar la concentración dietaria óptima ( $0,38 \text{ mg kg}^{-1}$  materia seca de alimento, Entre los peces teleósteos de importancia productiva en los que se ha evaluado la administración de SeMet como suplemento dietario se cuenta con la carpa gibel (*Carassius auratus gibelio*) [170, 171], el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) [174] y la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) [175].

### 3.2.2. Deficiencia

Entre los signos tempranos de deficiencia de Se en peces se ha reportado, la disminución de la actividad de la Gpx hepática y plasmática en varias especies de peces [171, 174-178] y la reducción de la tasa de crecimiento en la trucha arcoíris [179], la carpa [176] y el bagre [180]. No se han reportado otros signos de deficiencia de Se en peces. La combinación de vitamina E y Se en la dieta ha demostrado prevenir la distrofia muscular en el salmón del Atlántico [171] y la diátesis exudativa en la trucha arcoíris [181].

De acuerdo con Suttle [160], es laborioso producir o distinguir síntomas de la deficiencia de Se sin antes determinar el estado de disponibilidad orgánica de la vitamina E, ya que, la deficiencia de esta vitamina produce signos o síntomas similares. Aunque se ha documentado extensamente sobre los efectos de la deficiencia de Se en la reproducción de los animales de granja [160,163], en los peces el conocimiento relativo al efecto fisiológico, clínico y productivo de la deficiencia de Se es escaso [28].

Recientemente, Wischhusen *et al.* [172] reportaron que la suplementación con Se de una dieta formulada con una alta proporción de ingredientes de origen vegetal, mejoró índices reproductivos como el adelantamiento de la fecha de desove, incrementó la actividad de la enzima Gpx y otras enzimas involucradas en la respuesta antioxidante y elevó significativamente la concentración tisular de las vitaminas C y E en la trucha arcoíris. Pérez-Valenzuela *et al.* [32] indicaron que el co-cultivo de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  junto a la línea celular establecida a partir de células de la porción craneal (hematopoyética) de riñón de salmón (SHK-1) infectada con *P. salmonis*, incrementó tanto la expresión de la Gpx1 como la viabilidad celular y redujo la carga bacteriana. Luego, truchas arcoíris juveniles fueron alimentadas con dieta suplementada con levaduras enriquecidas con Se (LevSe) (almacenaron y sirvieron como transporte de Se orgánico) en concentraciones 1, 5 o 10 mg

LevSe Kg<sup>-1</sup> materia seca de alimento durante 60 días. Tras los 60 días de experimentación, se obtuvo el plasma sanguíneo de las truchas para ser ensayado en co-cultivo con SHK-1 infectadas con *P. salmonis*. Los autores concluyeron que el plasma de los peces que consumieron alimento suplementado con Se tuvo un efecto protector en SHK-1 infectadas. De acuerdo con Rise *et al.* [182] la infección con *P. salmonis* reduce la capacidad antioxidante y la concentración de Se en los salmónidos afectados.

### 3.2.3. Toxicidad

El metabolismo del Se en animales de granja ha sido estudiado ampliamente. A partir del conocimiento generado, se han propuesto mecanismos de toxicidad como: i) la sustitución de S por Se en reacciones y estructuras químicas importantes que pueden alterar la función e integridad celular, ii) la reacción entre el SeO<sub>3</sub> y el glutatión que reduce los niveles de tior celular libre y unido a proteínas, afectando la actividad de algunas enzimas y iii) la generación de ROS a partir de la interacción Se-tioles tisulares, incrementa la oxidación de lípidos (membranas biológicas), de proteínas estructurales y funcionales, y del material genético [160].

Dentro de los signos de toxicidad reportados en peces asociados a altas concentraciones de Se dietario se describen malformaciones teratogénicas en embriones y larvas [139], disfunciones de hormonas esteroidales de importancia reproductiva en la trucha arcoíris [183], disminución de la tasa de crecimiento en *I. punctatus* [184], disminución de la tasa de consumo de alimento y estrés oxidativo hepático en el esturión blanco (*Acipenser transmontanus*) [185, 186].

La tasa de absorción de Se es significativamente mayor en el intestino que en branquias. El epitelio branquial parece ser más selectivo que el intestinal dado que la tasa de absorción branquial de SeO<sub>3</sub> y el SeO<sub>4</sub> es reducida [189]. La expresión clínica y bioquímica de la intoxicación con Se ha mostrado muchas veces ser distinta entre especies de peces. Entre los factores considerados como responsables de las diferentes respuestas a una intoxicación con Se están las propiedades químicas y concentración de Se en el entorno del pez, las características fisicoquímicas del agua, las características fisicoquímicas del alimento que contiene al Se (ejemplo; presencia de fitatos) y el proceso de digestión y absorción del alimento en el intestino. Al respecto, Hamilton & Buhl [188], compararon efectos de la

administración de Se inorgánico, en altas concentraciones, al salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) y salmón coho, y concluyeron que esta última especie fue más susceptible a intoxicaciones con Se que *O. tshawytscha*.

El rango de concentración de Se requerido y tóxico es estrecho [139, 150,163]. De acuerdo con Hilton *et al.* [150] y Gatlin [74] en la trucha arcoíris y el bagre de canal, las manifestaciones de intoxicación dietaria por Se son pesquisables a partir de los 13 y 15 mg Se kg<sup>-1</sup> de materia seca de alimento, respectivamente

Se han reportado las siguientes alteraciones en algunas especies de peces juveniles producto de cuadros de toxicidad por Se dietario: reducción de tasas de crecimiento, pobre eficiencia de conversión y el aumento de la tasa de mortalidad [28]. Palace *et al.* [190] and Spallholz *et al.* [191] señalaron que uno de los mecanismos más importantes para el establecimiento de toxicidad por Se es la producción de ROS tisular, llevando a la presentación de estrés oxidativo (EO). Estos autores abordaron el metabolismo de la SeMet en embriones de trucha arcoíris y revelaron un incremento significativo de la concentración de ROS promovida por la alta producción de metilselenol a partir de SeMet.

La evidencia acumulada ha corroborado los resultados que muestran la inducción de ROS y el consecuente EO en diferentes especies de peces [170, 192, 193, 194]. Estudios realizados por Naderi *et al.* [195, 196], recientes informaron que la inducción del EO es responsable de las alteraciones en la neurotransmisión de dopamina en el cerebro y la cognición y el comportamiento en los peces.

#### 3.2.4. Biodisponibilidad

Las fuentes de Se utilizadas en la formulación de alimentos para peces de cultivo pueden ser inorgánicas (SeO<sub>3</sub>, o SeO<sub>4</sub>) u orgánicas (levaduras y bacterias selenizadas, SeMet y análogos), difiriendo entre si, en biodisponibilidad, metabolismo y toxicidad.

Son numerosas las investigaciones que han reportado la mayor biodisponibilidad de las fuentes orgánicas de Se en comparación con las fuentes inorgánicas en peces [164,184, 197-200]. Las levaduras y las bacterias enriquecidas con Se son microorganismos cuyo contenido citoplasmático de Se está en la forma Se<sup>0</sup> unido a cisteína (SeCys) a metionina

(SeMet) o como Se<sup>0</sup>Nps. Estas tres formas de Se son más biodisponibles que el Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> [201].

### 3.3. Nanopartículas de Se

La suplementación dietaria con Se para animales de producción puede ser llevada a cabo utilizando Se orgánico o inorgánico. El consenso general es que el Se orgánico, en forma de Se-aminoácidos y levadura enriquecida con Se, es más eficaz que el Se inorgánico aumentando tasas de crecimiento, mejorando el estado antioxidante e incrementando la concentración de Se en los tejidos. De igual forma, el aumento de la concentración de Se en el producto cárnico mejoraría su calidad nutricional.

Las Se<sup>0</sup>Nps, se han convertido en un interesante tema de investigación en los últimos años. En comparación con las formas orgánicas e inorgánicas tradicionales, las Se<sup>0</sup>Nps se han considerado como un aditivo alimentario prometedor para promover capacidades inmunológicas y antioxidantes debido a su gran área de superficie de contacto específica, mayor actividad biológica y menor toxicidad [202, 203].

Las Nps han captado el interés de los científicos debido a las propiedades únicas que tienen y a sus aplicaciones en el área de electrónica, cosmética, empaque y biotecnología, entre otras [204]. Para su síntesis se han descrito diferentes métodos, químicos y físicos, los cuales conllevan la desventaja del uso de solventes tóxicos, la generación de subproductos peligrosos y un gran consumo energético. Es por ello, que en la búsqueda de métodos para la obtención de Se<sup>0</sup>Nps a gran escala y bajo impacto ambiental se ha desarrollado la síntesis biológica [205, 206].

La reducción biológica del Se ha sido demostrada utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM) dada la presencia de depósitos electrodensos en citoplasma bacteriano y en el espacio extracitoplasmáticos y la observación de la adquisición de una coloración roja del cultivo bacteriano en caldo o colonias bacterianas. Como producto del proceso de reducción, se obtiene Se<sup>0</sup>. Independiente de su origen biológico, el Se<sup>0</sup> se encuentra comúnmente como partículas esféricas de diámetro en el rango de los nanómetros (nm), reportándose que sus propiedades fisicoquímicas son difíciles de reproducir en partículas sintetizadas utilizando otros métodos [207].

De acuerdo con la literatura, una vez que el selenito es reducido, el  $\text{Se}^0$  es depositado dentro de la célula (en el citoplasma o en el espacio periplásmico), en la superficie celular o en el espacio extracelular [208, 209]. El mecanismo de reducción no ha sido completamente descrito, sin embargo, algunos estudios sugieren que el sitio donde se encuentren los depósitos indicará el lugar donde ha ocurrido la reacción. Se ha reportado que, en bacterias anaeróbicas, los depósitos de  $\text{Se}^0$  se ubican en la superficie de la célula o en el espacio extracelular. Lo anterior se ha relacionado con la capacidad de transferencia electrónica del citocromo C pero también con alguna enzima reductasa asociada a la membrana [210-212].

Tomei *et al.* [213] demostraron la presencia de  $\text{Se}^0\text{Nps}$  dentro de la célula y extracelularmente como consecuencia de la lisis de cultivos en fase estacionaria. Sin embargo, Kessi *et al.* [214] reportaron que para la biosíntesis de  $\text{Se}^0\text{Nps}$  hay una primera fase donde el  $\text{Se}^0$  es movilizado por el citoplasma a través de proteínas transportadoras y que luego, en una segunda fase, se lleva a cabo la nucleación y crecimiento de las  $\text{Se}^0\text{Nps}$  hasta un tamaño determinado.

El control del tamaño es otro de los procesos que no ha sido bien comprendido, sin embargo, algunos estudios sugieren que ciertas proteínas bacterianas podrían tener un rol importante [206]. Es así como el uso de sistemas biológicos permitiría controlar el tamaño de las  $\text{Se}^0\text{Nps}$  para obtener partículas de menor diámetro [215]. La importancia de controlar el tamaño de las Nps radica en la dependencia que existe entre su tamaño y su actividad biológica. De acuerdo con lo reportado por Huang *et al.* [216] las nanopartículas de menor diámetro muestran una mayor captación de radicales libres.

El mecanismo de reducción del  $\text{SeO}_3$  ha sido estudiado desde distintos puntos de vista. Debido a que el  $\text{SeO}_3$  es altamente reactivo con grupos sulfhidrilos, se piensa que el glutatión (uno de los tioles más abundante en células eucariontes y procariontes) podría participar en la reducción de  $\text{SeO}_3$  a  $\text{Se}^0$  vía la reacción de Painter [217]. El  $\text{SeO}_3$  reacciona con el glutatión para formar Se-diglutatión el cual puede ser reducido por la enzima glutatión reductasa en presencia de NADPH a una forma inestable de persulfuro de Se, el que por dismutación, genera nuevamente glutatión y  $\text{Se}^0$  [218].

También se han propuesto sistemas enzimáticos como catalizadores de la reducción de  $\text{SeO}_3$ . En el caso de microorganismos que realizan respiración anaerobia, como por

ejemplo *Thauera selenatis*, la reacción sería catalizada por una enzima reductora de nitrito ubicada en el periplasma [219], reportándose que mutantes carentes de esta enzima son incapaces de reducir el nitrito o el  $\text{SeO}_3$  [219]. Otras proteínas que han sido reportadas como reductoras de  $\text{SeO}_3$  son las enzimas nitrato reductasa en *E. coli*, la arsenato reductasa en *Bacillus selenitireducens* y la hidrogenasa I en *Clostridium pasteurianum* [217].

Las bacterias aeróbicas capaces de reducir selenito incluyen diversas especies tales como *Rhizobium sp.* B1 [208], *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02 [221], *Pseudomonas sp.* CA5 [217], *Duganella sp.* y *Agrobacterium sp.* [222]. En microorganismos aerobios tampoco se conoce con certeza como ocurre la reducción de  $\text{SeO}_3$  a  $\text{Se}^0$ , sin embargo, se han sugerido al menos tres vías diferentes. El mecanismo más estudiado hasta ahora incluye la participación de una enzima nitrito reductasa del periplasma que fue descrita como responsable de la reducción de  $\text{SeO}_3$  en *T. selenatis* y en *Rhizobium selenitireducens*. Otro mecanismo se relacionaría con la precipitación redox tanto de S elemental ( $\text{S}^0$ ) como el  $\text{Se}^0$  vía la reducción del sulfato. Por último, se encontraría la reacción con glutatión como se describió previamente. Sin embargo, no se ha identificado algún gen o enzima responsable exclusivamente de la reducción de  $\text{SeO}_3$  [223].

De las bacterias reductoras de selenito, se destaca *Pantoea agglomerans*. Esta bacteria Gram negativa, aerobio facultativo pertenece a la familia de las Enterobacterias. *P agglomerans* UC-32 ha sido capaz de reducir tanto  $\text{SeO}_3$  como  $\text{SeO}_4$  y biosintetizar  $\text{Se}^0\text{Nps}$ , encontrándose depósitos de  $\text{Se}^0$  en citoplasma a partir de 10 h de incubación en presencia de  $\text{SeO}_3$  y también en el espacio extracelular luego de 20 h de incubación en las mismas condiciones [224].

Como ha sido señalado, aún no se ha propuesto un modelo que explique en su totalidad el mecanismo de la síntesis biológica de las  $\text{Se}^0\text{Nps}$ . La detección de proteínas involucradas en alguna de las etapas de síntesis de las  $\text{Se}^0\text{Nps}$ , podrían llevarnos a plantear un mecanismo de producción para, en el futuro, desarrollar protocolos que sean aplicables a nivel industrial.

### 3.3.1. Aplicaciones y usos de las $\text{Se}^0\text{Nps}$ .

Las aplicaciones del Se son variadas, su uso más común está en la industria del vidrio, proporcionando la coloración rojo rubí a dichos materiales o bien para contrarrestar el tinte



verde causado por impurezas del óxido de hierro. Igualmente ha sido ampliamente explotado en la industria electrónica debido a sus propiedades fotoeléctricas y semiconductoras, se ha utilizado como fertilizante y suplemento dietético y también como fungicidas y champú anticasca [225].

A nivel fisiológico el Se forma parte de las Se-proteínas ubicándose principalmente en el sitio activo donde cumple un rol estructural y enzimático. Estas Se-proteínas en general son conocidas por su poder antioxidante, por catalizar la producción de algunas hormonas y por su rol en el funcionamiento del sistema inmunológico. La primera enzima identificada fue la Gpx que oxida el glutatión y simultáneamente descompone el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (especie con alto poder oxidante). Esta oxidación se asocia a la reducción de NADPH y a la conversión de glucosa 6-fosfato en 6-fosfogluconato, protegiendo a las células frente al daño oxidativo principalmente a nivel hepático [226].

Alrededor de los años 90's se identificaron nuevas Se-proteínas participando en diversos procesos metabólicos en mamíferos, como en la regulación de la señalización intracelular y en el metabolismo de las hormonas tiroideas. Para lo último, la conversión de la hormona tiroxina (T4) a su forma activa biológicamente triyodotironina (T3) está mediada por las Se-enzimas yodotironina deiodinasas. La deficiencia de Se en la dieta impide la síntesis normal de las yodotironina deiodinasas afectando funciones celulares en animales y el ser humanos. Se ha reportado que los animales que consumen una dieta pobre en Se presentan una menor tasa de conversión de T4 a T3, evidenciable por el incremento de T4 y una disminución de T3 a nivel plasmático [227, 228].

Otro miembro de la familia de enzimas compuestas por selenio corresponde a la tioredoxina reductasa. Esta enzima es ubicua y forma el sistema tioredoxina catalizando la reducción de la tioredoxina oxidada utilizando NADPH como donador de electrones, además actúa como un sistema de transporte de hidrógeno de alta capacidad. Este sistema contribuye en las funciones celulares especialmente en regular las homeostasis redox. También se ha descrito que reduce la concentración de peróxidos lipídicos y peróxido de hidrógeno entre otros ROS, ejerciendo así su actividad antioxidante [229, 230].

Como se ha mencionado, el Se es un elemento traza esencial para los humanos y animales cuya incorporación en el organismo proviene fundamentalmente de la dieta (carne,

pescado, mariscos, vegetales y cereales). Una concentración pobre de Se en los vegetales ha sido asociada a suelos con una reducida concentración de este mineral [231] por lo que en algunas regiones del mundo una alternativa es la ingesta de suplementos nutricionales para enfrentar alteraciones producidas por su deficiencia como infertilidad, necrosis hepática, distrofia muscular, la enfermedad de Keshan y la enfermedad del músculo blanco entre otras [232].

Los efectos biológicos del Se, ya sean beneficiosos o tóxicos, dependerán de la concentración y forma química en que se encuentre, reportándose que los compuestos orgánicos de Se tienen mayor actividad biológica que los compuestos inorgánicos. El Se siendo parte de la SeMet ha demostrado tener mejor biodisponibilidad y menor toxicidad en comparación al Se constituyendo el  $\text{SeO}_3$  (forma química predominante en productos alimenticios y levaduras enriquecidas). Debido a la unión inespecífica de la SeMet a proteínas en lugar de la metionina es posible que el Se pueda ser acumulado en los tejidos hasta un nivel tóxico a causa del consumo excesivo de alimentos enriquecidos con este aminoácido.

A pesar de que el  $\text{Se}^0$  no es soluble y es considerado biológicamente inerte, pocos estudios se han enfocado en su uso como suplemento alimenticio. Se ha establecido la incidencia entre diversos tipos de cáncer y la deficiencia de Se en la dieta en modelos animales y en ensayos en humanos. A la vez, existen reportes que indican que el  $\text{Se}^0$  en forma de  $\text{Se}^0\text{Nps}$  presenta una alta actividad biológica que ha demostrado capacidades quimiopreventivas comparables a la SeMet pero con menor riesgo de toxicidad [229, 233, 234].

Reportes que indican que las  $\text{Se}^0\text{Nps}$  en asociación con albúmina de suero bovino fueron tóxicas para células tumorales e inocuas para células normales [235]. El mecanismo de la actividad quimiopreventiva de las  $\text{Se}^0\text{Nps}$  no está bien comprendido, pero se sugiere que ésta forma de Se una vez en citoplasma de células cancerígena sería inductor de ROS como el  $\text{O}_2$  alterando vías metabólicas, causando la muerte de la célula [236].

La literatura indica que las  $\text{Se}^0\text{Nps}$  presentan actividad biológica comparable al  $\text{SeO}_3$  pero con mucho menos toxicidad [216, 237, 238]. La utilización de las  $\text{Se}^0\text{Nps}$  en algunos tipos de cáncer no solo se debe a su acción directa sobre la célula cancerígena, sino que también se ha reportado que tiene una acción inmunoestimuladora. Esto se debe a que las

Se-proteínas son expresadas en la mayoría de las células, incluidas las del sistema inmunológico quienes participan de la respuesta inmune innata y adaptativa. Estudios indican que la administración oral de Se<sup>0</sup>Nps en un modelo de cáncer, ha resultado en el aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias tales como INF $\gamma$  y TNF $\alpha$  promoviendo la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T helper 1 (Th1) [239]. Es así como las Se<sup>0</sup>Nps podrían ser candidatas para reemplazar otras formas de Se utilizadas en suplementos nutricionales o farmacéuticos para la prevención del cáncer.

Finalmente, las Se<sup>0</sup>Nps producidas biológicamente constituye una opción no solo ventajosa operacionalmente por las condiciones de cultivo poco exigentes y amigables con el medio ambiente, sino que también constituye una forma sustentable de sintetizar un producto con alto valor agregado que muchas veces se encuentra ocasionando problemas ambientales.



## CAPÍTULO II

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## 1. HIPÓTESIS

En los últimos 5 años se han incrementado notablemente el número de investigaciones relacionadas al uso de Nps en diferentes campos como el de la ingeniería, la medicina y la producción animal, dando cuenta de la necesidad de la industria de incorporar este adelanto biotecnológico en sus procesos y productos.

En el Laboratorio de Microbiología Ambiental (LMA) de la Universidad de Concepción se logró la biosíntesis *in vitro* de Se<sup>0</sup>Np por *Pantoea agglomerans* y su funcionalización con L-cisteína (Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys) (Torres *et al.*, 2012). Por su parte Gajardo (2015) aisló desde el contenido intestinal de trucha arcoíris una cepa de bacteria ácido-láctica (LAB) con potencialidad probiótica y capacidad de biosintetizar Se<sup>0</sup>Nps (LAB-Se<sup>0</sup>Nps) igualmente *in vitro*. Sin embargo, el efecto de la suplementación dietaria con Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys o LAB-Se<sup>0</sup>Nps sobre parámetros fisiológicos y productivos en la trucha arcoíris de cultivo ha sido pobremente estudiado.

El aporte de nuestro trabajo radica en proponer al mundo científico y a la industria salmonicultora chilena y mundial, alternativas biotecnológicas de suplementación nutricional con Se<sup>0</sup>Nps biosintetizadas por bacterias, cuya producción sea sencilla, de bajo costo económico y ambientalmente amigable, destinadas a mejorar el rendimiento fisiológico y productivo de la trucha arcoíris de cultivo.

Planteamos como **hipótesis de trabajo**:

- H<sub>1</sub>:** La suplementación de la dieta con Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys incrementa las respuestas antioxidante e inmunológica y mejora índices productivos, comparada con la suplementación de la dieta con selenito de sodio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo.
- H<sub>2</sub>:** Desde el contenido intestinal de *O. mykiss* es posible obtener bacterias ácido-lácticas con potencialidad probiótica y productoras de Se<sup>0</sup>Nps como suplemento dietético para la trucha arcoíris de cultivo que incremente las respuestas antioxidante e inmune innata y mejore índices productivos, comparada con la suplementación dietaria con las mismas bacterias no enriquecidas con Se<sup>0</sup>.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Evaluar la administración dietaria de Se<sup>0</sup>Nps biosintetizadas por *Pantoea agglomerans* UC-32 y funcionalizadas con L-cisteína (Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys) o una o más cepas de bacteria ácido-láctica (LAB) con potencialidad probiótica como suplemento dietético para el mejoramiento del estado oxidativo, del desempeño inmunológico y de parámetros productivos en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Producir, funcionalizar con L-cisteína y caracterizar Se<sup>0</sup>Nps biosintetizadas por *Pantoea agglomerans* UC-32 y evaluar su capacidad antioxidante *in vitro* y toxicidad y efecto antioxidante en cultivos celulares de trucha arcoíris.
2. Evaluar el efecto de la suplementación dietaria con Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys sobre parámetros de estado oxidativo, de respuesta inmune y zootécnicos en la trucha arcoíris de cultivo.
3. Seleccionar, caracterizar e identificar LAB con potencialidad probiótica y capacidad de biosintetizar Se<sup>0</sup>Nps (LAB-Se<sup>0</sup>Nps) aisladas desde intestino de trucha arcoíris de cultivo.
4. Evaluar el efecto de la suplementación dietaria con LAB-Se<sup>0</sup>Nps sobre parámetros de estado oxidativo, de respuesta inmune y zootécnicos en la trucha arcoíris de cultivo.

### CAPÍTULO III: OBJETIVOS ESPECÍFICOS 1 Y 2

#### SELENIUM NANOPARTICLES BIOSYNTHESIZED BY *PANTOEA AGGLOMERANS* AND THEIR EFFECTS ON CELLULAR AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS IN THE RAINBOW TROUT *ONCORHYNCHUS MYKISS*

**Artículo publicado:** *Biology* **2022**, 11, 463. <https://doi.org/10.3390/biology11030463>

**Francisco Yanez-Lemus**<sup>1</sup>, Rubén Moraga<sup>2</sup>, Luis Mercado<sup>3</sup>, Carlos Jara-Gutierrez<sup>4</sup>, Carlos T. Smith<sup>1</sup>, Paulina Aguayo<sup>1,5,6</sup>, Kimberly Sanchez-Alonzo<sup>7</sup>, Apolinaria García-Cancino<sup>7</sup>, Ariel Valenzuela<sup>8</sup> and Victor L. Campos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Environmental Microbiology Laboratory, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Universidad de Concepcion, Concepcion 4070386, Chile; franciscoyanez@udec.cl (F.Y.-L.); csmith@udec.cl (C.T.S.); paulinaaguayo@udec.cl (P.A.).

<sup>2</sup>Microbiology Laboratory, Faculty of Renewable Natural Resources, Arturo Prat University, Iquique 1100000, Chile; rmoraga@unap.cl.

<sup>3</sup>Grupo de Marcadores Inmunológicos en Organismos Acuáticos, Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso 2340000, Chile; luis.mercado@pucv.cl.

<sup>4</sup>Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB), Facultad de Medicina, Escuela de Kinesiología, Universidad de Valparaíso, Valparaíso 2340000, Chile; carlos.jara@uv.cl.

<sup>5</sup>Faculty of Environmental Sciences, EULA-Chile, Universidad de Concepcion, Concepcion 4070386, Chile.

<sup>6</sup>Institute of Natural Resources, Faculty of Veterinary Medicine and Agronomy, Universidad de Las Américas, Sede Concepcion, Chacabuco 539, Concepcion 3349001, Chile.

<sup>7</sup>Laboratory of Bacterial Pathogenicity, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Universidad de Concepcion, Concepcion 4070386, Chile; kimsanchez@udec.cl (K.S.-A.); apgarcia@udec.cl (A.G.-C.).

<sup>8</sup>Laboratory of Pisciculture and Aquatic Pathology, Department of Oceanography, Faculty of Natural and Oceanographic Sciences, Universidad de Concepcion, Concepcion 4070386, Chile; avalenz@udec.cl.

\* Corresponding author; e-mail: [vcampos@udec.cl](mailto:vcampos@udec.cl); Tel.: +56-41-2204144.

## Abstract

The applications of nanoparticles (Nps) as food additives, health enhancers, and antimicrobials in animal production are increasing. The aim of this study was to evaluate the effect of selenium (Se) nanoparticles (Se<sup>0</sup>Nps) functionalized with L-cysteine (Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys), as a nutritional supplement, on immunological, oxidative status, and productive parameters in *O. mykiss*. TEM and SEM-EDS showed the accumulation of spherical Se<sup>0</sup>Nps entirely composed by elemental selenium (Se<sup>0</sup>) as intracellular and extracellular deposits in *Pantoea agglomerans* UC-32 strain. The in vitro antioxidant capacity of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys was significant more efficient ROS scavengers than Se<sup>0</sup>Nps and Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. We also evaluate the effect of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys on cell viability and oxidative stress in RTgill-W1, RTS-11, or T-PHKM *Oncorhynchus mykiss* cell lines. Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys showed less toxic and high antioxidant activity than Se<sup>0</sup>Nps and Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. Finally, the dietary Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys had a significant better effect on both plasma lysozyme and respiratory burst activity (innate immune response), on tissular Gpx activity (oxidative status), and on well-being (productive parameter) of *O. mykiss* when it is compared to Se<sup>0</sup>Nps and Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys is a promising alternative for nutritional supplement for *O. mykiss* with better performance than Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> and Se<sup>0</sup>Nps, easy to implementation, and reduced environmental impact.

**Keywords:** Se nanoparticles; *Pantoea agglomerans*; selenite; rainbow trout; cell viability; antioxidant activity; food supplement; immune response; glutathione peroxidase; growth parameters

## 1. Introduction

The rapid increase in the world population and its purchasing power explains the growing demand for food and the consequent rapid development of the aquaculture industry in recent decades [1,2]. Salmon farming is a relatively young industry, which harvested 230 thousand metric tons (mt) in 1990 and reached over 2 million mt in 2018 [3].

Globally, *Salmo salar* (Atlantic salmon) and *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) are among the 15 most traded fish species [3]. The high animal density associated with aquaculture favors the appearance of chronic stress in fish, negatively affecting production



[4]. In addition, in rainbow trout, chronic stress may induce oxidative stress (OE), [5] and organic depletion of vitamins and minerals, such as Se [6].

Se is an essential element for animals, and it participates in metabolic processes involved in development, growth, health, and fertility, and it is administered to cultured salmon as a nutritional supplement [7,8]. In addition, Se is a cofactor of multiple proteins (selenoproteins), including glutathione peroxidase and thioredoxin reductase [9], enzymes which contribute to remove reactive oxygen species (ROS), preventing OE [10]. Kohshahi *et al.* [11], demonstrated the immune-stimulating effect of different Se chemical forms when included as a nutritional supplement to channel catfish (*Ictalurus punctatus*).

Hilton *et al.* [12] reported that the daily requirement of Se for rainbow trout is between 0.15 to 0.38 mg kg<sup>-1</sup> dry-matter fed. Rider *et al.* [13] reported that, under stressful environmental conditions, the requirement could be increased up to 4.0 mg kg<sup>-1</sup> (dry mass). Chronic consumption of 13 mg Se kg<sup>-1</sup> (dry mass) caused evident signs of toxicity in rainbow trout, resulting, among others, in a decreased growth rate and high mortality [12].

Feeding fish, such as cultured salmonids, with high trophic levels requires the use of fishmeal and fish oil to adequately meet their nutritional needs [14]. Given the reduction in the stock of marine fish [8], food formulas are now including ingredients of vegetal origin to offset the fishmeal price increase [9]. According to Ytrestoyl *et al.* [14], multiple diets for salmonids include more than 70% of ingredients of plant origin.

Se natural concentration in fishmeal fluctuates between 1.5 and 3.1 mg kg<sup>-1</sup> [15] while in vegetal ingredients it varies barely from 0.01 to 0.16 mg kg<sup>-1</sup> [16]. Betancor *et al.* [17] reported that including raw material of vegetable origin to fishmeal could reduce the Se content in salmon fillet, reducing its nutritional value. This outcome may be the consequence of the presence of phytic acid in plants, reducing the availability of Se at the intestinal level of fish [18]. In order to achieve tissue concentrations of Se allowing an adequate development and well-being of farmed salmonid fish, it is necessary to supplement their diet with Se [19]. The chemical species of Se supplemented to fish, either organic (selenomethionine and selenocysteine) or inorganic (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>), affects the bioavailability of the micronutrient and has an impact on their metabolism [20]. The inorganic form (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) is less bioavailable and has a greater toxicity than the organic Se species in rainbow trout [21].

Nps, new biotechnological tools, possess unique physical and chemical properties and are increasingly being used in several fields, such as imaging, chemical sensors and biosensors, diagnostics, drug delivery, catalysis, energy, photonics, medicine [22], and veterinary medicine [23]. The applications of Nps as food additives, health enhancers, and antimicrobials in animal production are increasing [24,25]. Several authors reported a higher bioavailability and lower toxicity of Se when administered as Nps ( $\text{Se}^0\text{Nps}$ ) when compared to other chemical forms of Se and also that dietary supplementation with  $\text{Se}^0\text{Nps}$  in farmed fish contributes to the improvement of productive indices in intensive aquaculture [8,22–26].

Different chemical and physical methods have been described to produce  $\text{Se}^0\text{Nps}$ . In general, these methods involve the use of toxic solvents, the generation of dangerous by-products, and high-energy consumption [27]. On the other hand, since they can grow rapidly and they are easy to manipulate and to culture at a relatively low cost, bacteria are being used as micro-factories capable of biosynthesizing metal Nps [28]. In addition, biogenic Nps, such as  $\text{Se}^0\text{Nps}$ , can interact with different substances and the addition of functional chemical groups, or functionalization, (such as thiols, disulphurs, amines, carboxylic acids, phosphine, and other biomolecules) [29]. Functionalization provides Nps with advantages including, among others, inhibiting agglomeration, maintaining particle sizes compatible with metabolic activity, and improving bioavailability [29]. The above considerations encouraged us to produce and characterize functionalized  $\text{Se}^0\text{Nps}$  ( $\text{Se}^0\text{Nps}/\text{L-Cys}$ ) and to evaluate if they showed better effects than non-functionalized  $\text{Se}^0\text{Nps}$  or inorganic soluble Se ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) on cell viability and oxidative status in three types of cell cultures of *O. mykiss*. The effects of  $\text{Se}^0\text{Nps}/\text{L-Cys}$ ,  $\text{Se}^0\text{Nps}$ , and  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  as a nutritional supplement on immunological and oxidative status, and productive parameters for *O. mykiss* were also compared.

## 2. Material and methods

### 2.1. Biosynthesis, Purification, and Functionalization of $\text{Se}^0\text{Nps}$

*Pantoea agglomerans* UC-32, isolated from the sediments of Camarones river, northern Chile, was reported as a bacterial strain capable to produce  $\text{Se}^0\text{Nps}$  [30]. To produce  $\text{Se}^0\text{Nps}$ , *P. agglomerans* UC-32—kept at the culture collection of the Laboratory of Environmental Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences,

University of Concepcion, Concepcion, Chile—was cultured overnight under aerobic conditions in trypticase broth (TB) (Merck, Darmstadt, Germany) supplemented with 0.5 mM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> at 30° C with agitation (100 rpm) [30]. Cultures without Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> were used as negative control. The purification of Se<sup>0</sup>Nps biosynthesized by *P. agglomerans* UC-32 and its functionalization with L-cysteine were done as described by Chen *et al.* [25] and Tarrahi *et al.* [31], respectively. L-cysteine functionalized Se<sup>0</sup>Nps (Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys) were resuspended in 10 mL Leibovitz's L-15 medium (Gibco, Waltham, MA, USA) and stored at -80° C. Non-functionalized Se<sup>0</sup>Nps were obtained from fresh culture and stored at -80° C.

## 2.2. Characterization of Se<sup>0</sup>Nps Biosynthesized by *P. agglomerans* UC-32 Strain

The morphology and size of *P. agglomerans* UC-32 biosynthesized Se<sup>0</sup>Nps and Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys were evaluated by means of transmission electron microscopy (TEM) as described by Dhanjal and Cameotra [32] using a JEOL JSM 1200EX-II TEM microscope (JEOL, Peabody, MA, USA). Their chemical characterization was done by means of scanning electron microscopy energy dispersive X-ray Spectroscopy (SEM-EDS), as described by Torres *et al.* [30], using a JEOL JSM 6380LV SEM microscope (JEOL, Peabody, MA, USA).

## 2.3. Antioxidant Capacity of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys

The antioxidant capacity of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys, Se<sup>0</sup>Nps, and Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> was measured on the basis of their scavenging ROS capacity using three assays: the radical scavenging 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, and the total radical-trapping antioxidant parameter assay (TRAP). The DPPH assay was done following the procedure of Brand-Williams *et al.* [33]. The IC<sub>50</sub> value was calculated to determine the concentration of the sample required to inhibit 50% of the radicals. The lower the IC<sub>50</sub> value, the higher the antioxidant activity of samples [34]. The FRAP assay was done as described by Dudonné *et al.* [35] and the absorbance values obtained were interpolated in a Trolox calibration curve (0–200 mg L<sup>-1</sup>). The TRAP assay was done according to Romay *et al.* [36], and the absorbance values were interpolated in a Trolox standard curve (0–120 mg L<sup>-1</sup>). The absorbances of all three assays were obtained using an Epoch model microplate spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) adjusted to the appropriate wavelength for each assay. DPPH values were expressed as half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) in mg mL<sup>-1</sup>. FRAP and TRAP values were expressed in mM Trolox

equivalent antioxidant capacity (mM TEAC). Vitamin C (Merck, Darmstadt, Germany), Trolox (Merck, Darmstadt, Germany), and N-acetylcysteine (NAC) (Merck, Darmstadt, Germany) were used as positive controls. Different concentrations of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys, Se<sup>0</sup>Nps, or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, in the range of 50–500 µg mL<sup>-1</sup> in methanolic solution, were added to DPPH, FRAP, or TRAP solutions.

#### 2.4. Effect of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys in Rainbow Trout's Cells Culture (In Vitro Model)

##### 2.4.1. *Oncorhynchus mykiss* Cell Lines and Primary Head Kidney Monocyte-like Cells Culture

For in vitro assays, *O. mykiss* cell lines RTgill-W1 (normal epithelial gill cells; ATCC-CRL2523) and RTS-11 (spleen, monocyte/macrophage-like cells; RRID:CVCL\_F835) and primary head kidney monocyte-like (T-PHKM) culture cells were provided by Dr. Luis Mercado (Pontifical Catholic University of Valparaíso, Valparaíso, Chile). RTgill-W1 and RTS-11 cells were cultured in Leibovitz's L-15 medium (Gibco, Waltham, MA, USA) supplemented with 2% penicillin streptomycin (100 mg mL<sup>-1</sup> streptomycin, 100 IU mL<sup>-1</sup> penicillin (Gibco, Waltham, MA, USA) and 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco, Waltham, MA, USA) for RTgill-W1 cells or 30% FCS for RTS-11 cells. T-PHKM cells were obtained and cultured according to Abarca *et al.* [37]. The three cell lines were stabilized at 18° C overnight before been exposed to Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>.

##### 2.4.2. In Vitro Analysis of the Toxicity of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys

RTgill-W1 cells (4 x 10<sup>4</sup>), RTS-11 cells (5 x 10<sup>4</sup>) or T-PHKM cells (5 x 10<sup>4</sup>) in 100 µL Leibovitz's L-15 medium were placed in each well of 96 wells flat bottom microplates (Merck, Darmstadt, Germany) and cultured at 20° C. After 18 h of incubation, the culture medium was replaced with fresh medium supplemented with FCS and antibiotics, as indicated above, plus 160, 320, or 640 nM of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. The stock Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys suspension or selenite solution were prepared in L-15 Leibovitz's medium. Based on the data reported by Torres *et al.* [30], three concentrations of either Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (160, 320, or 640 nM) were used. L-15 Leibovitz's medium plus RTgill-W1, RTS-11, or T-PHKM cells was used as control in every experiment. After 23 h of culture, 10 µL of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt (WST-1) (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) were added to each well following the manufacturer's instructions. Cellular viability was measured at 450 nm using an Epoch microplate

spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Cytotoxicity of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> was expressed as percentage of viable cells with respect to the control. All experiments were carried out in triplicate.

#### 2.4.3. *In Vitro Effect of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress on Rainbow Trout Cell Cultures*

The effect of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced toxicity was evaluated in RTgill-W1, RTS11, and T-PHKM cells measuring cellular ROS concentration according to Singh *et al.* [38]. Briefly, RTgill-W1 cells (4 x 10<sup>4</sup> cells), RTS-11 cells (5 x 10<sup>4</sup> cells) or T-PHKM cells (5 x 10<sup>4</sup> cells) in 100 µL L-15 Leibovitz's medium were placed in each well of 96-well flat bottom microplates (Merck, Darmstadt, Germany) and cultured at 20° C with Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (160, 320 or 640 nM) for 24 h. Then, L-15 Leibovitz's medium was carefully extracted and replaced with fresh medium containing 100, 150, or 300 µM hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) as a cellular ROS-inducing agent [39] at 20° C during 24 h. According to Kling and Olsson [40], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations chosen were non-lethal for rainbow trout cell lines. After this incubation period, 1 µM of the fluorescent probe 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (Carboxy-DCFH-DA) (Molecular Probes/Invitrogen Waltham, MA, USA) was added and cultures maintained at 20° C in the dark for additional 30 min. The oxidation of carboxy-DCFH into highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) by intracellular ROS was evaluated by the fluorescent absorbance value using a microplate reader PR 4100 TSC (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Cells were sampled and fluorescence was measured according to Chen *et al.* [41]. The ROS effects on cell viability of RTgill-W1, RTS11, and T-PHKM cells were also determined using the same procedure described in Section 2.4.2. The assays were carried out in triplicate.

#### 2.5. *Effect of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys Supplemented Food in Rainbow Trout's (In Vivo Model)*

##### 2.5.1. *Feeding Trial Design*

All animals used in this study were treated in accordance with the Biosecurity Regulations and Ethical Protocols approved by University of Concepcion Ethics Committee. Apparently healthy 160 rainbow trout having an initial weight of 104.53 ± 8.47 g (mean ± SE) and an initial length of 20.8 ± 3.32 cm (mean ± SE) were obtained from Salmones Pangué (Florida, Chile) and transported to an environmentally controlled semi-closed recirculation

system (Laboratory of Pisciculture and Aquatic Pathology (LPAP)), Faculty of Natural Sciences and Oceanography, University of Concepcion, Concepcion, Chile. Trout were kept in fiberglass tanks, at  $15.5 \pm 0.8$  °C and a maximum density of  $25 \text{ kg fish m}^{-3}$ , containing  $8.1 \pm 0.08 \text{ mg L}^{-1}$  dissolved oxygen and under a 12:12 light:dark photoperiod [42].

Twenty fish were randomly distributed in each one of 8 tanks. Two tanks were assigned to each one of the below described four different diets assayed, totalling 40 fish per diet group. Fish were acclimated for 21 days, time span in which they were fed an acclimatization diet including the minimum rainbow trout selenium requirement according to the National Research Council (NRC) [19]. The four diets were administered during a 30-day period; one group (control group) received the same acclimatization diet. The three experimental diets were enriched with 5 mg of Se nanoparticles ( $\text{Se}^0\text{Nps}$ ), of L-cysteine functionalized Se nanoparticles ( $\text{Se}^0\text{Nps/L-Cys}$ ), or inorganic Se ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) per kg dry food to obtain a non-toxic diet [13,14]. To prepare the diets, the approximate yield of  $\text{Se}^0\text{Nps}$  of a 1 L culture of *P. agglomerans* culture was determined. All diets were prepared weekly, according to Vera [43], by Cargill-Ewos (Coronel, Chile) containing 39–43% crude protein, 10–16% lipid, 3–4% fiber, 9–12% ash, 7–13% moisture, 1–2% calcium, and 1–1.4% phosphate. Fish were fed twice daily (10:00 h and 16:00 h) receiving 2% of their average body weight per day. Eight fish per tank were weighed (BLC 1500 scale, Boeco, Hamburg, Germany) at the beginning of the feeding trial, and subsequently when samples were taken, and the amount of food given adjusted accordingly.

### 2.5.2. Fish Sampling

On days 0, 15, and 30, six fish from each experimental or control group were carefully captured, sacrificed by an overdose of the anesthetic BZ-20 (50 ppm of sodium p-aminobenzoate in fresh water; Veterquimica, Santiago, Chile) and then individually weighted (BLC 1500 scale; Boeco, Hamburg, Germany) and measured from the tip of the snout to the rear edge of the fork at the center of the tail fin. Blood was extracted from the caudal vein of each fish, by means of a heparinized 18G needle fitted to a 5 mL syringe and transferred to sterile microtubes containing 0.02 mL of  $1000 \text{ U mL}^{-1}$  heparin (Merck, Darmstadt, Germany). Additionally, samples of liver and dorsal muscle were obtained. Samples were immediately transported at 4° C to the Laboratory of Environmental Microbiology, University of Concepcion,

where plasma was obtained by centrifugation at 5000 x g for 10 min, and liver and dorsal muscle were fragmented. Then, plasma, liver and dorsal muscle were stored at -80° C.

### 5.2.3. Innate Immune Responses

Plasma lysozyme activity and ROS concentration in white blood cells (WBCs) of six rainbow trout per sampling day and diet were measured. A turbidimetric assay was used to determine plasma lysozyme activity level [44]. Briefly, 950 µL of buffered substrate (0.25 mg of *Micrococcus lysodeikticus* in 1 mL of buffered 40 mM sodium phosphate pH 6.2) was mixed with 50 µL of fish plasma. The absorbance of the samples was measured at times 0 and 30 min of incubation at room temperature by means of an Epoch spectrophotometer at 450 nm (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). A 0.001 min<sup>-1</sup> absorbance reduction was evaluated as one unit of lysozyme activity [44].

For ROS concentration measurements, an assay evaluating the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) into colored formazan by oxidizing agents was used following the method of Anderson and Siwicki [45].

### 2.5.4. Activity of the Antioxidant Enzyme Glutathione Peroxidase (Gpx)

The glutathione peroxidase (Gpx) activity was assayed in plasma, according to Lawrence and Burk [46] and liver and dorsal muscle as described by Fontagné-Dicharry *et al.* [21]. Gpx activity in plasma samples was evaluated immediately after thawing. In the case of liver and muscle, samples were rapidly thawed and homogenized in 10 volumes (w/v) of ice-cold saline for 3 min and centrifuged for 15 min at 4000 x g and the supernatants collected to evaluate the activity of GPx. Gpx activity present in the supernatants was measured in a solution of 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), 1 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Germany), 2 mM sodium azide (Merck, Darmstadt, Germany), 2 mM reduced glutathione (GSH) (Merck, Darmstadt, Germany), 0.1 mM NADPH (Merck, Darmstadt, Germany), and 0.2 mM glutathione reductase (Merck, Darmstadt, Germany) following the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 µM) at 30° C and 340 nm. One unit of Gpx activity was reported as 1 mol NADPH consumed per min per mg of plasma protein, using the appropriate molar absorptivity coefficient for NADPH (6220 mol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Plasma proteins were measured by the method of Lowry *et al.* [47].

### 2.5.5. Effect of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys on Trout Growth Performance and Survival Rate

The effects of Se<sup>0</sup>Nps, Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> on productive parameters of the fish were evaluated every five days. Weight and length of each trout and the number of dead fish were recorded to calculate the specific growth rate (SGR), weight gain (WG), condition factor (CF), and survival rate (%), according to Naderi *et al.* [8] and Lugert *et al.* [48] using the following Equations:

$$\text{SGR (\% increase body wt d.}^{-1}\text{)} = \left[ \frac{(\ln w_2 - \ln w_1)}{\text{days}} \right] \times 100$$

$$\text{WG (g)} = w_2 - w_1$$

$$\text{CF} = \left[ \frac{W}{L^3} \right] \times 100$$

$$\text{Survival rate (\%)} = \left[ \frac{n_2}{n_1} \right] \times 100$$

where w<sub>1</sub> = starting weight (g); w<sub>2</sub> = final weight (g); days = days in the growth period; w = weight (g); L = length (cm); n<sub>1</sub> = initial number of fish; n<sub>2</sub> = final number of fish.

When the three different diet and one-control groups were made up, the initial condition factor (ICF) was considered (similar sizes and weights) to make sure that the initial populations of each group were homogeneous with respect to the development stage and the nutritional condition.

### 2.6. Statistics

One-way analysis of variance (ANOVA) followed by an LSD multiple comparison test was used to determine the statistical significance for multiple comparisons. The Student's t-test was used for pairwise comparisons. Values of p < 0.05 were considered as statistically significant. All statistical tests were performed using the GraphPad Prism software version 7 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com), accessed on 22 July 2020).

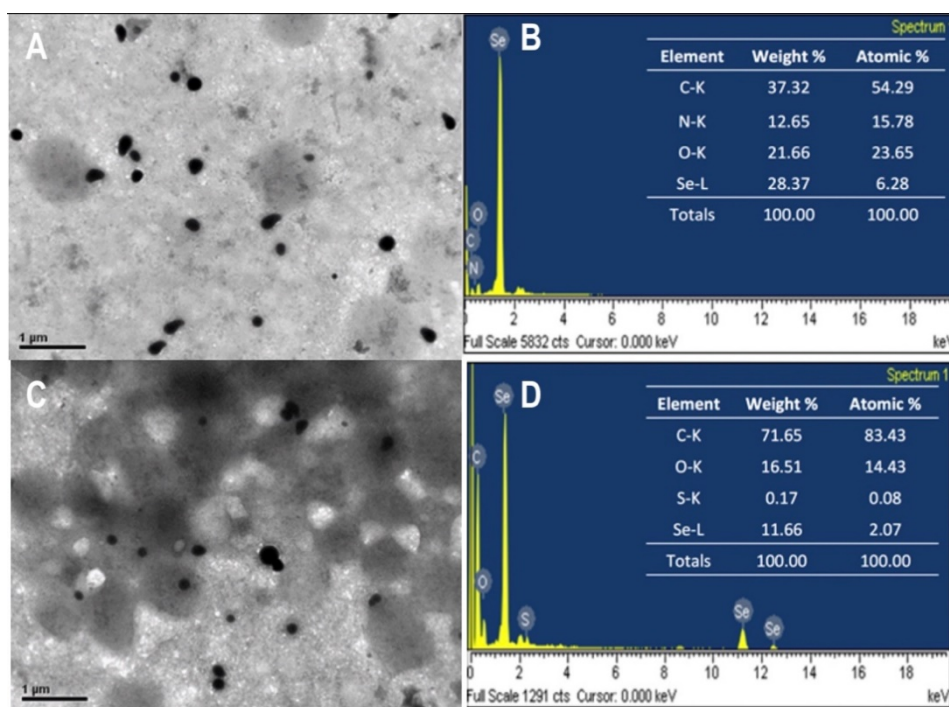


### 3. Results

#### 3.1. Characterization of Se<sup>0</sup>Nps Biosynthesized by *P. agglomerans* UC-32 without and after Functionalization

The size and morphology of the biosynthesized Se<sup>0</sup>Nps and Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys were analyzed by TEM. TEM observations revealed that both Se<sup>0</sup>Nps and Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys were sphere-like nanoparticles with sizes between 53 to 170 nm and 32 to 160 nm in diameter, respectively (Figure 1A,C, respectively), which indicated that Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys were significantly smaller than non-functionalized Se<sup>0</sup>Nps ( $p < 0.05$ ). SEM-EDS analysis of Se<sup>0</sup>Nps and Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys showed the presence of peaks corresponding to Se, confirming that the nanoparticles were mainly composed of Se. The presence of C, N and O signals can be ascribed to cell debris (Figure 1B,D). In the case of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys, a sulphur (S) peak was, as expected, also observed due to the thiol sidechain of cysteine, confirming their functionalization (Figure 1D).





**Figure 1.** Selenium nanoparticles produced by *Pantoea agglomerans* UC-32 strain without functionalization (Se<sup>0</sup>Nps) and after L-cysteine functionalization (Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys). (A): TEM micrograph of Se<sup>0</sup>Nps among *P. agglomerans* UC-32 cell debris, (B): SEM-EDS data obtained from Se<sup>0</sup>Nps, (C): TEM micrograph of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys among *P. agglomerans* UC-32 cell debris, (D): SEM-EDS data obtained from Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys.

### 3.2. Antioxidant Capacity of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys

The antioxidant activity of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys, Se<sup>0</sup>Nps and Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> was evaluated in vitro using the DPPH, FRAP and TRAP assays (Table 1). Data in Table 1 were obtained by using 500 μg mL<sup>-1</sup> of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys, Se<sup>0</sup>Nps or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>.

The DPPH assay showed that the ROS scavenger activity of the positive controls (Vit C, Trolox and NAC) was significantly better than that of the three forms of Se tested. Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys and Se<sup>0</sup>Nps were more efficient ROS scavengers than Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> ( $p < 0.05$ ). When comparing both types of Nps, the functionalized ones were significantly better ( $p < 0.05$ ) ROS scavengers than the non-functionalized ones.

Regarding the FRAP assay, the positive Vit C control was a better ROS scavenger than the NAC control and all three Se compounds ( $p < 0.05$ ). Antioxidant capacity of Se<sup>0</sup>Nps was higher than Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys ( $p > 0.05$ ) and Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> ( $p < 0.05$ ). Finally, the TRAP assay

showed that Vit C control had the highest antioxidant activity ( $p < 0.05$ ). Regarding Se compounds, a similar antioxidant activity pattern to DPPH was detected. Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys was a significant better ROS scavenger than Se<sup>0</sup>Nps and Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> ( $p < 0.05$ ).

**Table 1.** In vitro radical scavenging capacity of 500 µg mL<sup>-1</sup> Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys, Se<sup>0</sup>Nps and Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>.

	<b>FRAP</b> (TEAC mM) ± SD	<b>DPPH</b> IC <sub>50</sub> (mg mL <sup>-1</sup> ) ± SD	<b>TRAP</b> (TEAC mM) ± SD
Se <sup>0</sup> Nps/L-Cys	0.10 ± 0.03	1.96 ± 0.71	0.19 ± 0.04
Se <sup>0</sup> Nps	0.09 ± 0.01	2.53 ± 0.91	0.15 ± 0.02
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.06 ± 0,01	3.47 ± 0.49	0.08 ± 0.01
Vit C	0.26 ± 0.06	0.77 ± 0.08	0.85 ± 0.01
Trolox	n.a	1.14 ± 0.06	n.a
NAC	0.05 ± 0.02	1.42 ± 0.19	0.16 ± 0.01

DPPH: radical scavenging 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay; FRAP: ferric reducing antioxidant power assay; TRAP: total radical-trapping antioxidant parameter assay; IC<sub>50</sub>: half-maximal inhibitory concentration. TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity; Vit C: vitamin C; NAC: N-acetylcysteine; n.a: not applicable.

### 3.3. Toxicity of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys for Cell Lines RTgill-W1 and RTS-11 and Primary Culture T-PHKM

The toxicity of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys for the cells was expressed in percentage of viable RTgill-W1, RTS-11 or T-PHKM cells when co-cultured with Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or, for comparison, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> during 24 h (Table 2). The cytotoxicity for both cell lines and the primary culture was dose dependent showing a decreasing cell viability as the concentration of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> increased. When comparing with the control, the viability of the cells assayed was not significantly reduced ( $p < 0.05$ ) only when RTgill-W1 (95.64%), RTS-11 (96.39%) or when T-PHKM (96.52%) cells were exposed to either 160 nM Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or 160 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. When comparing the effect of a same Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> concentration, all three cell types showed higher viabilities when exposed to 160, 320 or 640 nM Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys than to Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. Results for RTgill-W1 cells showed significant higher viabilities ( $p < 0.05$ ) when they were exposed to 160, 320 or 640 nM Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys than to Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. In the case of RTS-11

cells, viabilities when exposed to 640 nM Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> were 95.67% and 93.74%, respectively, when compared to the control ( $p < 0.05$ ). On the other hand, similar concentrations of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> caused no significant differences ( $p > 0.05$ ) in the survival of T-PHKM cells. Finally, the analysis of cell viability at different concentrations of the same form of Se (Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) showed significant differences ( $p < 0.05$ ) between 160 nM and 640 nM in the three cellular types, being 640 nM more toxic than 160 nM of both Se sources.

**Table 2.** Effect of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> on the cell viability of cell lines RTgill-W1, RTS-11 and T-PHKM.

Cells	Se <sup>0</sup> Nps/L-Cys (nM)			Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> (nM)		
	160	320	640	160	320	640
RTgill-W1	95.64 ± 1.83	94.47 ± 2.22	92.66 ± 1.97	93.43 ± 2.35	92.05 ± 2.23	90.25 ± 1.67
RTS-11	96.39 ± 1.13	96.92 ± 1.45	95.67 ± 1.20	95.35 ± 1.65	95.05 ± 1.94	93.74 ± 2.21
T-PHKM	96.52 ± 0.43	96.05 ± 1.25	94.02 ± 1.13	96.13 ± 1.25	94.23 ± 1.30	93.33 ± 1.30

Results are expressed as percentage of viable cells when compared to control (cells not subjected to Se) assigned as 100%.

### 3.4. Effect of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress in Cell Lines RTgill-W1 and RTS-11 and T-PHKM Primary Cell Culture

A significant reduction ( $p < 0.05$ ) in cell viability was observed when the cell viability of all three cell types treated with 100, 150 or 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (positive controls) was compared to cells not treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (negative controls), being the highest H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration the one causing the largest cell viability reduction in the three cell lines assayed. When the cell viability of the three cell types was compared, RTS cells demonstrated better viabilities than RTgill-W1 or T-PHKM cells when subjected to 100, 150 or 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $p < 0.05$ ) (Figure 2).

RTS-11, RTgill-W1 and T-PHKM cells cultured in the presence of 160, 320 or 640 nM Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> and then subjected to 100, 150 or 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> showed to better retain their viability when compared to the positive controls in a dose dependent manner, being the best cell viabilities obtained in the cultures containing 640 nM Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. Similarly, as observed in the positive controls, RTS-11 cells showed better viabilities

when compared to RTgill-W1 or T-PHKM at all Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> concentrations. RTgill-W1 was the cell type showing the lowest cell viabilities. Cell viabilities in all experimental groups were significantly less ( $p < 0.05$ ) than those of the negative controls and significantly better ( $p < 0.05$ ) than those of positive controls (Figure 2).

Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys (Figure 2) showed to provide a better protection than Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> to RTS-11, RTgill-W1 and T-PHKM cells in all the experimental groups exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 3). RTS-11 cells cultured in the presence of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys showed to retain a better cell viability than the one achieved in the presence of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, being it significant in the experimental groups 160 + 100 (86.67% vs. 83.61%, respectively), 160 + 150 (71.85% vs. 67.69%, respectively), 160 + 300 (60.74% vs. 57.99%, respectively), 320 + 150 (73.16% vs. 69.28%, respectively), 320 + 300 (60.81% vs. 57.04%, respectively), 640 + 150 (77.39% vs. 72.93%, respectively) and 640 + 300 (63.76% vs. 58.05%, respectively). On the other hand, RTgill-W1 cells plus Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys showed a significant better viability that the same cell type plus Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> in the experimental groups 160 + 300 (53.01% vs. 50.55%, respectively), 320 + 150 (70.37% vs. 64.16%, respectively), 640 + 150 (74.11% vs. 70.02%, respectively), 320 + 300 (57.32% vs. 54.98%, respectively) and 640 + 300 (60.81% vs. 55.45%, respectively). Finally, primary culture T-PHKM cells subjected to Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys showed a viability significantly better than T-PHKM subjected to Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> in the groups 160 + 150 (70.51% vs. 66.82%, respectively), 160 + 300 (54.40% vs. 51.73%, respectively), 320 + 150 (71.13% vs. 67.03%, respectively), 320 + 300 (57.61% vs. 53.63%, respectively), 640 + 150 (74.88% vs. 71.49%, respectively) and 640 + 300 (61.14% vs. 57.91%, respectively) (Figure 2).

### *3.5. In Vitro Effect of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys on ROS Concentration in Cell Lines RTgill-W1 and RTS-11 and Primary Culture T-PHKM*

The effect of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys on ROS scavenging was evaluated on RTgill-W1, RTS-11 and T-PHKM cells pre-treated with Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> and then subjected to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The assay used measures the fluorescence emitted by DCF resulting from the oxidation of Carboxy-DCFH by intracellular ROS.

As shown in Figure 3, the concentration of cellular ROS in RTgill-W1, RTS-11 and T-PHKM cells co-cultured with Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (160, 320 or 640 nM) for 24 h was increased respect to each cell type negative control (only cells) in a concentration-dependent

manner. T-PHKM cells co-cultured with 320 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> and RTgill-W1, RTS-11 and T-PHKM cells co-cultured with 640 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> significantly increased the cellular ROS concentration compared to observed in the negative control and three cell types under similar concentration of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys ( $p < 0.05$ ).

A markedly increased ( $p < 0.05$ ) cellular ROS of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced RTgill-W1, RTS-11 and T-PHKM positive controls cells (cells plus 100, 150 or 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in a dose-dependent manner when compared to the respective negative controls, was observed. RTgill-W1, RTS-11 and T-PHKM cells pre-incubated with 160, 320 or 640 nM Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys significantly reduced the increased cellular ROS concentration induced by 100, 150 or 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a concentration-dependent manner compared to registered in positive controls (Figure 3). A better performance in reducing cellular ROS concentration of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys than Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> in all experimental groups of each cell type, was noted (Figure 3). Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys was a significant ( $p < 0.05$ ) better cellular ROS concentration reducer than Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> in 320 + 100, 320 + 150, 320 + 300, 640 + 100, 640 + 150, 640 + 300 groups in RTgill-W1, RTS-11 and T-PHKM cells.

### 3.6. Effect of Se<sup>0</sup>Nps/L-cys Supplemented Food in Rainbow Trout (In Vivo Model)

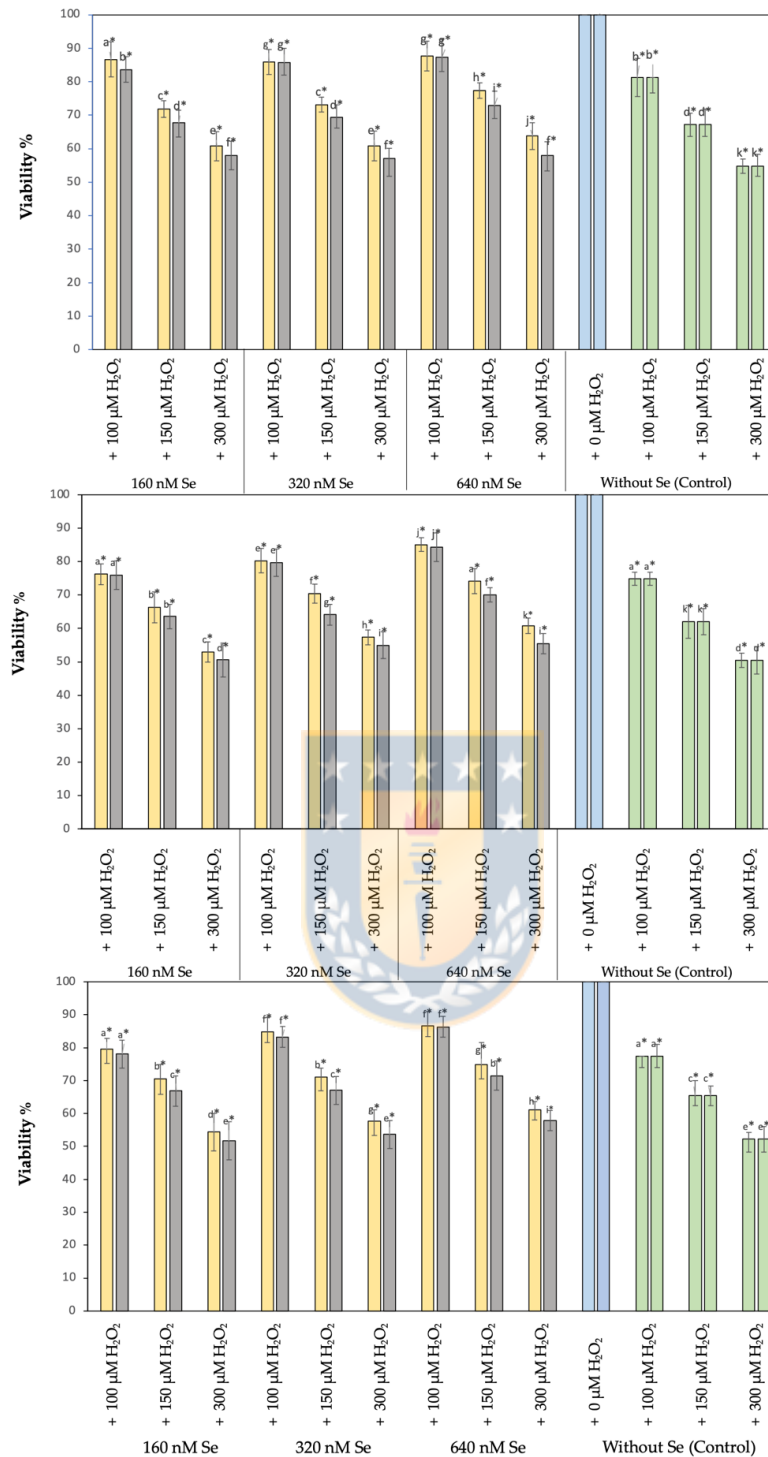
#### 3.6.1. Innate Immune Responses

Plasma lysozyme activity was assessed by its capacity to lyse *Micrococcus lysodeikticus* and ROS production by leukocytes was assessed by an assay evaluating NBT reduction. Regarding plasma lysozyme activity (Table 3). Since day 15, the plasma lysozyme activity of fish receiving Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys supplemented food was significantly increased when compared to the control group and the group receiving Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> supplement food ( $p < 0.05$ ). On day 30, lysosome activity of the group receiving Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys supplemented food was also significantly higher than the group receiving Se<sup>0</sup>Nps supplemented food ( $p < 0.05$ ).

ROS production by peripheral leukocytes was evaluated by the reduction of NBT into the colored compound formazan; therefore, higher absorbances at the wavelength at which formazan absorbs correspond to higher ROS concentrations (Table 4). On the day 15, an increase of cellular ROS of trout receiving Se<sup>0</sup>Nps ( $p < 0.05$ ) or Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys ( $p > 0.05$ ) when compared to the control group, was observed. Samplings on day 30 showed that the group receiving Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys supplemented food significantly increased formazan levels, when

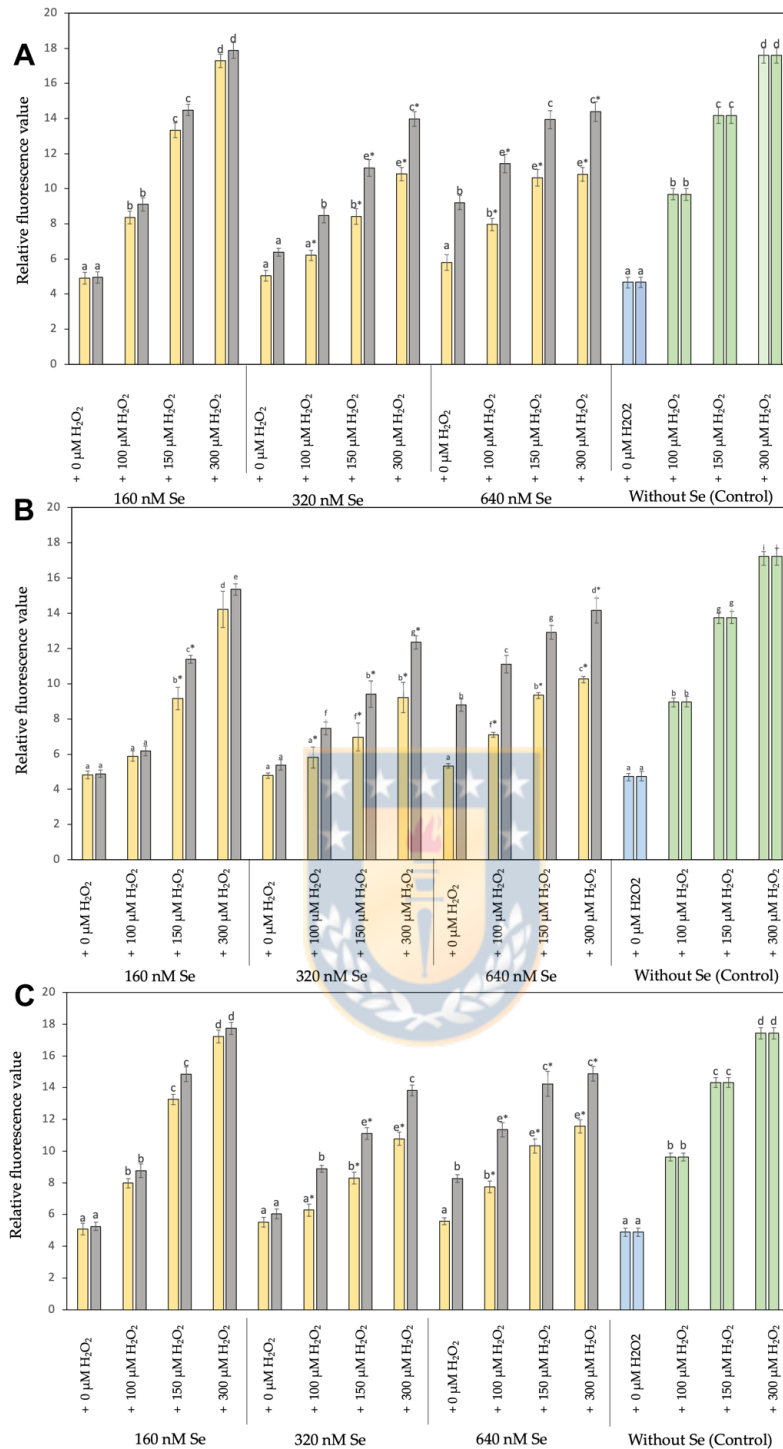
compared to the groups whose diet was supplemented with  $\text{Se}^0\text{Nps}$  or  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  ( $p < 0.05$ ). On day 30, ROS concentration in the group receiving  $\text{Se}^0\text{Nps}$  was also significantly higher than the one in the group receiving  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  ( $p < 0.05$ ).





**Figure 2.** Cell viability (as percentage of the negative control ■) of cell lines RTS-11 (**A**), RTgill-W1 (**B**) and of the primary culture T-PHKM (**C**) treated with Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys ■ or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> ■ and then subjected to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a ROS inducing agent. All data is given as mean ± SD. Positive controls ■. Different letters on top of bars indicate significant differences among groups. \* Statistically different to the negative control.





**Figure 3.** Level of intracellular ROS on cell lines RTS-11 (**A**), RTgill-W1 (**B**) and of the primary culture T-PHKM (**C**) treated with Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys (yellow) or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (grey) and then subjected to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a ROS inducing agent. All data is given as mean ± SD. Different letters on top of bars indicate significant differences among groups. \* Significant reduction of cellular ROS concentration compared to the positive controls (green). Negative control (blue).

**Table 3.** Plasma lysozyme activity (in U mL<sup>-1</sup>) in rainbow trout fed with 5 mg kg<sup>-1</sup> Se dry diet supplemented food for 30 days.

Day	Dietary Treatment			
	Se <sup>0</sup> Nps/L-Cys	Se <sup>0</sup> Nps	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Control
0	35.25 ± 3.3	35.11 ± 4.1	36.56 ± 3.8	36.37 ± 3.9
15	41.47 ± 2.8	39.13 ± 4.7	38.21 ± 3.6	37.14 ± 4.1
30	46.40 ± 2.5	43.34 ± 2.6	41.07 ± 3.3	37.53 ± 2.1

One unit (U) of lysozyme activity corresponds to the amount of lysozyme that caused a decrease in absorbance of 0.001 min<sup>-1</sup>. Se<sup>0</sup>Nps: Non-functionalized biogenic Se nanoparticles, Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys: L-Cysteine functionalized biogenic Se nanoparticles. Data is given as mean ± SD; *n* = 15 in each sampling day per dietary treatment.

**Table 4.** ROS production by blood leukocytes, evaluated by NBT reduction into formazan, in rainbow trout. Fish were fed with 5 mg kg<sup>-1</sup> Se dry diet supplemented food for 30 days.

Day	Dietary Treatment			
	Se <sup>0</sup> Nps/L-Cys	Se <sup>0</sup> Nps	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Control
0	0.44 ± 0.11	0.44 ± 0.013	0.45 ± 0.18	0.46 ± 0.014
15	0.46 ± 0.14	0.49 ± 0.020	0.44 ± 0.11	0.43 ± 0.017
30	0.49 ± 0.02	0.45 ± 0.013	0.41 ± 0.24	0.40 ± 0.021

NBT: nitroblue tetrazolium, Se<sup>0</sup>Nps: Biogenic Se nanoparticles (non-functionalized), Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys: L-Cysteine functionalized biogenic Se nanoparticles; Data is given as mean ± SD; *n* = 15 in each sampling day per dietary treatment.

### 3.6.2. Activity of the Antioxidant Enzyme Gpx

The activity of the enzyme Gpx in plasma, liver and dorsal muscle of rainbow trout fed with Se<sup>0</sup>Nps, Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> supplemented food for 30 days is shown in Table 5. Significant increases in Gpx activity were observed in plasma, liver and dorsal muscle in the three groups receiving Se supplemented diet when compared to the control group (*p* < 0.05). Moreover, the group receiving the diet supplemented with Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys showed a significant higher muscle tissue Gpx activity when compared to the group receiving Se<sup>0</sup>Nps (*p* < 0.05) and a significant higher Gpx activity in plasma, liver and muscle tissue when compared to the group receiving Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (*p* < 0.05).

**Table 5.** Glutathione peroxidase (Gpx) activity in rainbow trout fed with 5 mg kg<sup>-1</sup> Se dry diet supplemented food at day 30.

		Dietary Treatment			
		Se <sup>0</sup> Nps/L-Cys	Se <sup>0</sup> Nps	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Control
Gpx activity	Plasma	279.39 ± 7.17	274.25 ± 5.86	271.80 ± 8.47	257.36 ± 4.30
	Liver	29.46 ± 3.71	28.31 ± 3.31	26.67 ± 3.19	22.01 ± 2.06
	Muscle	40.06 ± 3.04	36.26 ± 3.64	34.02 ± 1.83	25.98 ± 2.85

Gpx: Glutathione peroxidase expressed in mU mg<sup>-1</sup> protein. Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys: L-Cys functionalized biogenic Se nanoparticles; Se<sup>0</sup>Nps: Non-functionalized biogenic Se nanoparticles. Data is given as mean ± SD; *n* = 15 per dietary treatment.

### 3.6.3. Growth Performance and Survival

Growth performance and survival rate of fish receiving the different dietary treatments during the 30 days of analysis is shown in Table 6. Weight gain (WG) and specific growth rate (SGR) values were not significantly different among groups (*p* > 0.05). Nevertheless, the final condition factor (FCF) of trout fed food enriched with Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys (1.68%) was significantly higher than FCF of the control group (1.27%), Se<sup>0</sup>Nps (1.52%) and Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (1.45%) groups (*p* < 0.05).

**Table 6.** Growth performance and survival rate of rainbow trout fed with 5 mg kg<sup>-1</sup> Se dry diet supplemented food for 30 days.

Index	Dietary Treatment			
	Se <sup>0</sup> Nps/L-Cys	Se <sup>0</sup> Nps	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Control
IW (g fish <sup>-1</sup> )	101.77 ± 4.63	102.26 ± 4.63	103.11 ± 4.64	104.57 ± 4.69
FW (g fish <sup>-1</sup> )	179.66 ± 2.71	178.14 ± 3.59	175.76 ± 2.61	174.45 ± 3.86
WG (g)	78.00 ± 4.25	76.28 ± 6.15	72.69 ± 6.69	70.54 ± 6.63
SGR (%)	1.89 ± 0.12	1.86 ± 0.17	1.78 ± 0.21	1.72 ± 0.18
ICF (%)	1.22 ± 0.12	1.26 ± 0.19	1.23 ± 0.10	1.24 ± 0.11
FCF (%)	1.68 ± 0.35	1.52 ± 0.26	1.45 ± 0.23	1.27 ± 0.24
Survival rate (%)	100	100	100	100

Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys: L-Cysteine functionalized biogenic Se nanoparticles; Se<sup>0</sup>Nps: Biogenic Se nanoparticles (non-functionalized); IW: initial weight; FW: final weight; WG: weight gain; SGR: specific growth rate; ICF: initial condition factor; FCF: final condition factor. Survival rate at the end of the assay (day 30); Data is given as mean ± SD; *n* = 15.

#### 4. Discussion

Se is an essential element used by animal organisms, including fish, to carry out physiological processes for an adequate development as required by each species [19]. This chemical element indirectly contributes to remove and prevent oxidative stress, acting as an exogenous antioxidant [48], and plays an integral role in the immune and endocrine systems [49].

Intense fish culture systems maximize the effect of stressors, favoring the rising of diseases along with ensuing important economic losses [50]. According to Baldissera *et al.* [51], the onset and progression of fish infectious diseases are usually mediated by oxidative stress as well as oxidative damage. Thus, the supplementation of salmonid fish food with

Se is necessary to maintain the optimal health and growth of farm-raised fish [52]. Nevertheless, there are conflicting reports on the literature about the effects of different sources of Se supplementation, including inorganic Se and Se nanoparticles, on the physiological parameters of fish species [53].

In the present work, predominantly spherical Se<sup>0</sup>Nps were produced by the cytoplasmic Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> reduction by the bacterium *P. agglomerans* [54]. The detection of a sulfur (S) peak by SEM-EDS only in L-Cys treated Se<sup>0</sup>Nps (Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys) confirmed the functionalization of the nanoparticles. L-Cys has proven to be effective as a functionalizing agent for nanoparticles due to the presence of a -SH group in its structure [30]. According to Prasanth and Sudarsanakumar [55], Se<sup>0</sup>Nps functionalization with L-Cys results from the anchoring of the thiol group of cysteine to the surface of the nanoparticles.

TEM results showed that Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys were significantly smaller than non-functionalized Se<sup>0</sup>Nps. This phenomenon could be associated to the anti-agglomeration property of L-Cys as reported by Perni *et al.* [56], who indicated L-Cys reduces the surface energy of the silver (Ag) nanoparticles enhancing their separation and preventing further agglomeration. L-Cys has been used as a functionalizing agent not only for Se<sup>0</sup>Nps but also for other Nps of other chemical composition, such as copper (Cu) [57], zinc (Zn) [58], silver (Ag) [59], and gold (Au) [60]. Several authors have reported the use of L-Cys as a functionalizing agent to obtain smaller Nps [35,61,62].

Our results suggest that Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys were more effective as in vitro ROS scavengers than Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. The higher ROS scavenging activity of the functionalized Nps, when compared to non-functionalized Se<sup>0</sup>Nps, also suggests that the smaller size of the functionalized Se<sup>0</sup>Nps and the independent ROS scavenging activity of L-Cys anchored to the surface of the Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys combine their effects to increase the ROS scavenging activity exerted by Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys. With respect the involvement of the size of the Nps on their ROS scavenging capacity, Huang *et al.* [63] concluded that the ROS scavenging effect, measured by the DPPH assay, is higher as Se<sup>0</sup>Nps are smaller. These authors evaluated Se<sup>0</sup>Nps of three different sizes and Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> as ROS scavengers. In concordance with our findings, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> showed the poorest ROS scavenging activity when compared to Se<sup>0</sup>Nps. Matsuura *et al.* [64] evaluated the effect of L-Cys as a ROS scavenger when integrated to the surface of a 4.44 nm drug carrier L-serine (Ser)-modified polyamidoamine dendrimer. These authors concluded that L-Cys contributed to the ROS- and radical-scavenging efficacy when compared to the dendrimer without L-Cys. Significant antioxidant activity differences among Se<sup>0</sup>Nps and inorganic Se forms and positive controls has been previously reported [65,66].

Our results suggest that Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys were more biocompatible than Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> in RTgill-W1, RTS-11, and T-PHKM cells. Similar results were reported by Xu *et al.* [67] comparing cell viability after co-culturing Se<sup>0</sup>Nps or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> with human normal colon mucosal epithelial cells (NCM460). These authors reported a significant reduction of the viability of NCM460 cells by 0.39 g/mL Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> while the cell toxicity of *Lactobacillus casei* 393 strain biosynthesized Se<sup>0</sup>Nps was observed in the presence of 25 g mL<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. A greater antioxidant activity of Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys than Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> has also been demonstrated in a cellular model using human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) [30].

The pre-treatment of RTgill-W1, RTS-11, or T-PHKM cells with Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys effectively reduced, exceeding Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, the oxidative effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the two cell lines and the primary cell culture assayed in the present work. Studies support that the exposition of a cell culture to 100 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causes cellular oxidative damage and/or OS [68]. According to Mou *et al.* [69], metabolic alterations in cells (melanocytes) by the oxidative effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> directly influence the rate increase of cell apoptosis. In addition, the pre-treatment with 640 nM Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys was a better attenuator of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage than 640 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, improving the cell viability and reducing intracellular ROS concentration in the cells studied.

Our results, using RTgill-W1 and RTS-11 cells, suggest that Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys could also contribute to alleviate the effect of oxidative environmental pollutants able to damage gill tissue of rainbow trout. According to Franco *et al.* [70] and Bopp *et al.* [71] the greater sensitivity of RTgill-W1 cells to ROS inducing toxins, when compared to some other cell types, could be related to a greater tendency for DNA fragmentation. In this sense, Ucar *et al.* [72] revealed insecticides, one of the most worldwide common environmental pollutants which negatively affect the health of aquatic organisms, including fish, produce higher genotoxicity and apoptosis in gill cells than in liver cells of rainbow trout due to oxidative damage [73]. Tkachenko *et al.* [74] assessed the effect of vaccination on the oxidative status of rainbow trout, showing that the activities of Gpx, as well as glutathione reductase (GR), were significantly reduced in the muscles and gills of trout vaccinated against furunculosis suggesting that vaccination induced oxidative stress in these organs.

An increase of the activity of plasmatic lysozyme was observed in the rainbow trout receiving Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys in their diet. The increase of plasma lysozyme levels in fish may be

associated to an increased proliferation rate of phagocytic cells or to an increase in the number of lysosomes; therefore, assessing the activity of this enzyme seems to be an appropriate marker to evaluate the innate immune response in fish [75]. Kohshahi *et al.* [11] reported a significant increase of lysozyme activity when rainbow trout food was supplemented with chemically synthesized Se<sup>0</sup>Nps as compared to a dietary enrichment with Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. Harsij *et al.* [76] also reported a significant increase of plasmatic lysozyme in rainbow trout administered synthetic Se<sup>0</sup>Nps combined with vitamins C and E. The use of Se<sup>0</sup>Nps as food supplement in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) also significantly increased their plasma lysozyme activity when compared to the control group and to the group receiving Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> supplementation [77].

Phagocytes produce respiratory bursts for the purpose of eliminating foreign pathogens during phagocytosis and have been widely used to evaluate the defense against pathogens. Superoxide anion along with hydroxyl radicals and nitric oxides are induced reactive oxygen species, which are related to enhancing microbial killing capacity of macrophages [78,79]. Data from the present study showed that rainbow trout fed with Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys had higher respiratory burst activity (increase in the concentration cytoplasmatic ROS of blood leukocytes) on days 30 of the feeding trial when compared with the other groups. These results agreed with reports by Dawood *et al.* [80] and Xia *et al.* [81] who showed an increase in respiratory burst in blood phagocytes of *O. niloticus* and *Danio rerio*, respectively, fed for 8 weeks [82] and 9 days [83], respectively, with diets enriched with chemically synthesized Se<sup>0</sup>Nps.

All organisms have developed a variety of antioxidant defense systems to constantly suppress the production of ROS and remove them in cells of aerobic organisms [50]. Gpxs represent an important enzyme family, which protects living organisms from oxidative damage, catalyzing the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and organic hydroperoxides [83]. The Gpx activity in blood (plasma), liver, and muscle suggests that enriching the diet with Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys would induce a better capacity of the antioxidant system to counteract the effect of ROS on the tissues of rainbow trout because it favors a larger Gpx activity, as already reported by Saffari *et al.* [54]. These authors reported that plasma Gpx was significantly higher in common carps (*Cyprinus carpio*) fed with Se<sup>0</sup>Nps than in fish treated with a basal diet (control) or a diet enriched with Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. Naderi *et al.* [26] reported a significantly high Gpx activity in the

hepatic tissue of rainbow trout receiving chemically synthesized Se<sup>0</sup>Nps when compared to the control animals. Khan *et al.* [50] indicated that the dietary administration of Se<sup>0</sup>Nps significantly increased Gpx activity in liver and muscle tissues of juvenile *Tor putitora* when compared to the control.

No relationship was observed between food supplemented with Se<sup>0</sup>Np, Se<sup>0</sup>Np/L-Cys, or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> and fish weight. This observation agrees with reports by Naderi *et al.* [26] who evaluated the effect of dietary supplementation with Se<sup>0</sup>Nps on SGR and other production parameters in *O. mykiss* under stress causing conditions. Nevertheless, Harsij *et al.* [76] reported a significant increase of the growth rate in juvenile rainbow trout chronically exposed to sublethal concentrations of ammonium and fed with food supplemented with a mixture of chemically synthesized Se<sup>0</sup>Nps and vitamins C and E when compared to the control (only ammonium). The authors postulated that the assayed mixture may have favored the synthesis of the selenoenzyme deiodinase, which is directly involved in the release of the growth hormone from the pituitary gland in vertebrates, including fish [84].

In the present study, the final condition factor (FCF) at the end of the assay, day 30, was better in rainbow trout receiving the Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys supplemented diet. A FCF above 1.00 corresponds to a good health condition or well-being of fish and it correlates with an increase of important production parameters, such as fertility rate, which involves the production of high-quality gametes [85,86]. Our results suggest that supplementation of the diet with Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys, when compared to Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, may favor a better efficiency of rainbow trout accumulating energy reserves.

## 5. Conclusions

Supplementation of rainbow trout diet with Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys had positive effect on fish innate immune response parameters, oxidative status, well-being, and growth. Se<sup>0</sup>Nps/LCys is a promising alternative for nutritional supplementation for rainbow trout with better performance than Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, ease of implementation, and reduced environmental impact.



## 6. References

1. Fouré, J.; Bénassy-Quéré, A.; Fontané, L. Modelling the world economy at the 2050 horizon. *Econ. Transit.* **2013**, 21, 617–654.
2. Ellis, T.; Turnbull, J.; Knowles, T.G.; Lines, J.A.; Auchterlonie, N.A. Trends during development of Scottish salmon farming: An example of sustainable intensification? *Aquaculture* **2016**, 458, 82–99.
3. Iversen, A.; Asche, F.; Øystein, H.; Nystøyl, R. Production cost and competitiveness in major salmon farming countries 2003–2018. *Aquaculture* **2020**, 522, 735089.
4. Yarahmadi, P.; Miandare, H.K.; Fayaz, S.; Caipang, C.M.A. Increased stocking density causes changes in expression of selected stress- and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* **2015**, 48, 43–53.
5. Trenzado, C.E.; Morales, A.E.; Palma, J.M.; de la Higuera, M. Blood antioxidant defenses and hematological adjustments in crowded/uncrowded rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on diets with different levels of antioxidant vitamins and HUFA. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **2009**, 149, 440–447.
6. Küçükbay, F.Z.; Yazlak, H.; Karaca, I.; Sahin, N.; Tuzcu, M.; Cakmak, M.N.; Sahin, K. The effects of dietary organic or inorganic selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under crowding conditions. *Aquac. Nutr.* **2009**, 15, 569–576.
7. Takahashi, K.; Suzuki, N.; Ogra, Y. Effect of gut microflora on nutritional availability of selenium. *Food Chem.* **2020**, 319, 126537.
8. Mahdi Naderi, M.; Keyvanshokoo, S.; Salati, A.P.; Ghaedi, A. Combined or individual effects of dietary vitamin E and selenium nanoparticles on humoral immune status and serum parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under high stocking density. *Aquaculture* **2017**, 474, 40–47.
9. Kousha, M.; Yeganeh, S.; Amirkolaie, A.K. Synergistic effect of sodium selenite and *Pediococcus acidilactici* on growth, intestinal bacterial counts, selenium bioavailability, hepatic enzymes and non-specific immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Nutr.* **2019**, 26, 74–87.
10. Baeverfjord, G.; Prabhu, P.A.; Fjellidal, P.G.; Albrektsen, S.; Hatlen, B.; Denstadli, V.; Ytteborg, E.; Takle, H.; Lock, E.-J.; Berntssen, M.H.G.; et al. Mineral nutrition and bone health in salmonids. *Rev. Aquac.* **2018**, 11, 740–765.

11. Kohshahi, A.J.; Sourinejad, I.; Sarkheil, M.; Johari, S.A. Dietary cosupplementation with curcumin and different selenium sources (nanoparticulate, organic, and inorganic selenium): Influence on growth performance, body composition, immune responses, and glutathione peroxidase activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* **2019**, *45*, 793–804.
12. Hilton, J.W.; Hodson, P.V.; Slinger, S.J. The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Nutr.* **1980**, *110*, 2527–2535.
13. Rider, S.A.; Davies, S.J.; Jha, A.N.; Fisher, A.A.; Knight, J.; Sweetman, J.W. Supra-nutritional dietary intake of selenite and selenium yeast in normal and stressed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Implications on selenium status and health responses. *Aquaculture* **2009**, *295*, 282–291.
14. Ytrestøyl, T.; Aas, T.S.; Åsgård, T. Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture* **2015**, *448*, 365–374.
15. Sanden, M.; Hemre, G.-I.; Måge, A.; Lunestad, B.T.; Espe, M.; Lundebye, A.-K.; Ørnstrud, R. Program for Overvåking av Fiskefôr. Nasjonalt Institutt for Ernærings-og Sjømatforskning (NIFES). **2013**. Available online: [https://www.mattilsynet.no/dyr\\_og\\_dyrehold/for/overvaakingsprogram\\_fiskefor\\_2013.16731/binary/Overv%C3%A5kingsprogram%20fiskef%C3%B4r%202013](https://www.mattilsynet.no/dyr_og_dyrehold/for/overvaakingsprogram_fiskefor_2013.16731/binary/Overv%C3%A5kingsprogram%20fiskef%C3%B4r%202013) (accessed on 20 September 2021).
16. Sanden, M.; Hemre, G.-I.; Måge, A.; Lunestad, B.T.; Espe, M.; Lie, K.K.; Lundebye, A.-K.; Amlund, H.; Waagbø, R.; Ørnstrud, R. Program for Overvåking av Fiskefôr. Nasjonalt Institutt for Ernærings-og Sjømatforskning (NIFES). **2017**. Available online: <https://www.hi.no/resources/publikasjoner/rapporter-nifes/2017/forrapport2017.pdf> (accessed on 20 September 2021).
17. Betancor, M.B.; Dam, T.M.C.; Walton, J.; Morken, T.; Campbell, P.J.; Tocher, D.R. Modulation of selenium tissue distribution and selenoprotein expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with graded levels of plant ingredients. *Br. J. Nutr.* **2016**, *115*, 1325–1338.
18. Marta, S.; Silva, M.S.; Kröckel, S.; Prabhu, P.A.J.; Koppe, W.; Ørnstrud, R.; Waagbø, R.; Araujo, P.; Amlund, H. Apparent availability of zinc, selenium and manganese as inorganic metal salts or organic forms in plant-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **2019**, *503*, 562–570.

19. Committee on the Nutrient Requirements of Fish and Shrimp & National Research Council (NRC). Nutrient Requirements of Fish and Shrimp; National Academies Press: Washington, DC, USA, **2011**.
20. Pacitti, D.; Wang, T.; Page, M.M.; Martin, S.A.M.; Sweetman, J.; Feldmann, J.; Secombes, C.J. Characterization of cytosolic glutathione phospholipid-hydroperoxide peroxidase and glutathione peroxidase genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their modulation by in vitro selenium exposure. *Aquat. Toxicol.* **2013**, 130–131, 97–111.
21. Fontagné-Dicharry, S.; Godin, S.; Liu, H.; Prabhu, P.A.J.; Bouyssière, B.; Bueno, M.; Tacon, P.; Médale, F.; Kaushik, S. Influence of the forms and levels of dietary selenium on antioxidant status and oxidative stress-related parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Br. J. Nutr.* **2015**, 113, 1876–1887.
22. Petros, R.A.; DeSimone, J.M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9, 615–627.
23. Cholewinska, E.; Ognik, K.; Fotschki, B.; Zdunczyk, Z.; Juskiwicz, J. Comparison of the effect of dietary copper nanoparticles and one copper (II) salt on the copper biodistribution and gastrointestinal and hepatic morphology and function in a rat model. *PLoS ONE* **2018**, 13, e0197083.
24. Adegbeye, M.J.; Elghandour, M.M.; Barbabosa-Pliego, A.; Monroy, J.C.; Mellado, M.; Salem, A.Z. Nanoparticles in Equine Nutrition: Mechanism of Action and Application as Feed Additives. *J. Equine Vet. Sci.* **2019**, 78, 29–37.
25. Chen, T.; Wong, Y.S.; Zheng, W.; Bai, Y.; Huang, L. Selenium nanoparticles fabricated in *Undaria pinnatifida* polysaccharide solutions induce mitochondria-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2008**, 67, 26–31.
26. Naderi, M.; Keyvanshokoh, S.; Salati, A.P.; Ghaedi, A. Proteomic analysis of liver tissue from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under high rearing density after administration of dietary vitamin E and selenium nanoparticles. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genom. Proteom.* **2017**, 22, 10–19.
27. Dobias, J.; Suvorova, E.I.; Bernier-Latmani, R. Role of proteins in controlling seleniumnanoparticle size. *Nanotechnology* **2011**, 22, 195605.
28. Arshad, A. Bacterial Synthesis and Applications of Nanoparticles. *Nano Sci. Nano Technol.* **2017**, 11, 119.

29. Subbiah, R.; Veerapandian, M.; Yun, K.S. Nanoparticles: Functionalization and Multifunctional Applications in Biomedical Sciences. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 4559–4577.
30. Torres, S.K.; Campos, V.L.; León, C.G.; Rodríguez-Llamazares, S.M.; Rojas, S.M.; González, M.; Smith, C.T.; Mondaca, M.A. Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Pantoea agglomerans* and their antioxidant activity. *J. Nanoparticle Res.* **2012**, *14*, 1236.
31. Tarrahi, R.; Khataee, A.; Movafeghi, A.; Rezanejad, F.; Gohari, G. Toxicological implications of selenium nanoparticles with different coatings along with Se<sup>4+</sup> on *Lemna minor*. *Chemosphere* **2017**, *181*, 655–665.
32. Dhanjal, S.; Cameotra, S.S. Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. *Microb. Cell Factories* **2010**, *9*, 52.
33. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30.
34. Bensaci, C.; Ghiaba, Z.; Dakmouche, M.; Belfar, A.; Belguidoum, M.; Bentebba, F.Z.; Saidi, M.; Hadjadj, M. In Vitro Evaluation of Antioxidant Potential of Date Palm Collected in Algeria using Electrochemical and Spectrophotometrical Techniques. *Korean Chem. Eng. Res.* **2021**, *59*, 153–158.
35. Dudonné, S.; Vitrac, X.; Coutière, P.; Woillez, M.; Mérillon, J. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1768–1774.
36. Romay, C.; Pascual, C.E.L.; Lissi, E.A. The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1996**, *29*, 175–183.
37. Abarca, A.; Bethke, J.; Narváez, E.; Flores, R.; Mercado, L. Parameters to evaluate the immunostimulant effect of Zymosan A in head kidney leucocytes (HKL) of salmonids. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* **2012**, *40*, 545–552.
38. Singh, S.P.; Rastogi, R.P.; Hader, D.P.; Sinha, R.P. Temporal dynamics of ROS biogenesis under simulated solar radiation in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Protoplasma* **2014**, *251*, 1223–1230.
39. Holmström, K.M.; Finkel, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 411–421.

40. Kling, P.; Olsson, P.-E. Involvement of differential metallothionein expression in free radical sensitivity of RTG-2 and CHSE-214 Cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *28*, 1628–1637.
41. Chen, L.-D.; Liu, Z.-H.; Zhang, L.-F.; Yao, J.-N.; Wa, C.-F. Sanggenon C induces apoptosis of colon cancer cells via inhibition of NO production, iNOS expression and ROS activation of the mitochondrial pathway. *Oncol. Rep.* **2017**, *38*, 2123–2131.
42. Valenzuela, A.; Campos, V.; Yañez, F.; Alveal, K.; Gutiérrez, P.; Rivas, M.; Contreras, N.; Klempau, A.; Fernandez, I.; Oyarzun, C. Application of artificial photoperiod in fish: A factor that increases susceptibility to infectious diseases? *Fish Physiol. Biochem.* **2012**, *38*, 943–950.
43. Vera, B. Bio-Obtención de Nanopartículas de Selenio y su Potencial Aplicación Como Suplemento Alimentario Inmunoestimulante en Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Bachelor's Thesis, University of Concepcion, Concepción, Chile, March **2016**.
44. Takemura, A.; Takano, K. Lysozyme in the ovary of tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Its purification and some biological properties. *Fish Physiol. Biochem.* **1995**, *14*, 415–421.
45. Anderson, D.; Siwicki, A. Measuring the effects of contaminants on fish by haematological and serological methods. In *Modulators of Fish Immune Responses*; Stolen, J., Anderson, D., Zelikoff, S., Twerdok, L., Kaattari, S., Eds.; SOS Publications: Fair Haven, NJ, USA, **1993**; pp. 95–118.
46. Lawrence, R.; Burk, R. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *71*, 952–958.
47. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
48. Lugert, V.; Thaller, G.; Tetens, J.; Schulz, C.; Krieter, J. A review on fish growth calculation: Multiple functions in fish production and their specific application. *Rev. Aquac.* **2014**, *8*, 30–42.
49. Mansour, A.T.-E.; Goda, A.A.; Omar, E.A.; SaberKhalil, H.; Esteban, M.-A. Dietary supplementation of organic selenium improves growth, survival, antioxidant and immune status of meagre, *Argyrosomus regius*, juveniles. *Fish Shellfish Immunol.* **2017**, *68*, 516–524.
50. Khan, K.U.; Zuberi, A.; Nazir, S.; Fernandes, J.B.K.; Jamil, Z.; Sarwar, H. Effects of dietary selenium nanoparticles on physiological and biochemical aspects of juvenile *Tor putitora*. *Turk. J. Zool.* **2016**, *40*, 704–712.

51. Baldissera, M.D.; Souza, C.F.; Parmeggiani, B.; Leinritz, G.; Verdi, C.M.; Santos, R.V.; Stefani, L.M.; Baldisserotto, B. The disturbance of antioxidant/oxidant balance in fish experimentally infected by *Aeromonas caviae*: Relationship with disease pathophysiology. *Microb. Pathog.* **2018**, *122*, 53–57.
52. Farzad, R.; Kuhn, D.; Smith, S.; O’Keefe, S.; Hines, I.; Bushman, T.; Galagarza, O.; Stevens, A. Effects of selenium-enriched prebiotic on the growth performance, innate immune response, oxidative enzyme activity and microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **2021**, 735980.
53. Saffari, S.; Saeed Keyvanshokoo, S.; Zakeri, M.; Johari, S.A.; Pasha-Zanoosi, H.; Mozanzadeh, M.T. Effects of dietary organic, inorganic, and nanoparticulate selenium sources on growth, hemato-immunological, and serum biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiol. Biochem.* **2018**, *44*, 1087–1097.
54. Daza, C.; Campos, V.; Rojas, C.; Rodríguez-Llamazares, S.; Smith, C.; Mondaca, M. Reduction of selenite to elemental Selenium by *Pantoea agglomerans*. *Gayana* **2016**, *80*, 67–74.
55. Prasanth, S.; Sudarsanakumar, C. Elucidating the interaction of L-cysteine-capped selenium nanoparticles and human serum albumin: Spectroscopic and thermodynamic analysis. *New J. Chem.* **2017**, *41*, 9521–9530.
56. Perni, S.; Hakala, V.; Prokopovich, P. Biogenic synthesis of antimicrobial silver nanoparticles capped with L-cysteine. *Colloids Surf. A* **2013**, *460*, 219–224.
57. Prasanth, S.; Rithesh Raj, D.; Vineeshkumar, T.V.; Thomas, R.K.; Sudarsanakumar, C. Exploring the interaction of L-cysteine capped CuS nanoparticles with bovine serum albumin (BSA): A spectroscopic study. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 58288–58295.
58. Li, L.; Zhang, Q.; Ding, Y.; Cai, X.; Gu, S.; Cao, Z. Application of L-cysteine capped core-shell CdTe/ZnS nanoparticles as a fluorescence probe for cephalexin. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 2715–2721.
59. Wojnicki, M.; Luty-Błocho, M.; Kotanska, M.; Wyrwal, M.; Tokarski, T.; Krupa, A.; Kołaczkowski, M.; Bucki, A.; Kobielski, M. Novel and effective synthesis protocol of AgNPs functionalized using L-cysteine as a potential drug carrier. *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch. Pharmacol.* **2017**, *391*, 123–130.
60. Majzik, A.; Patakfalvi, R.; Hornok, V.; Dékány, I. Growing and stability of gold nanoparticles and their functionalization by cysteine. *Gold Bull.* **2009**, *42*, 113–123.

61. Zhang, W.; Zhang, L.; Sun, Y. Size-controlled green synthesis of silver nanoparticles assisted by L-cysteine. *Front. Chem. Sci. Eng.* **2015**, 9, 494–500.
62. Chatterjee, A.; Priyam, A.; Das, S.K.; Saha, A. Size tunable synthesis of cysteine-capped CdS nanoparticles by  $\gamma$ -irradiation. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, 294, 334–342.
63. Huang, B.; Zhang, J.; Hou, J.; Chen, C. Free radical scavenging efficiency of nano-se in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, 35, 805–813.
64. Matsuura, S.; Katsumi, H.; Suzuki, H.; Hirai, N.; Takashima, R.; Morishita, M.; Sakane, T.; Yamamoto, A. L-Cysteine and L-Serine Modified Dendrimer with Multiple Reduced Thiols as a Kidney-Targeting Reactive Oxygen Species Scavenger to Prevent Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *Pharmaceutics* **2018**, 10, 251.
65. Bai, K.; Hong, B.; Huang, W.; He, J. Selenium-Nanoparticles-Loaded Chitosan/Chitooligosaccharide Microparticles and Their Antioxidant Potential: A Chemical and in vivo Investigation. *Pharmaceutics* **2020**, 12, 43.
66. Forootanfar, H.; Adeli-Sardou, M.; Nikkhoo, M.; Mehrabani, M.; Amir-Heidari, B.; Shahverdi, A.R.; Shakibaie, M. Antioxidant and cytotoxic effect of biologically synthesized selenium nanoparticles in comparison to selenium dioxide. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2014**, 28, 75–79.
67. Xu, C.; Qiao, L.; Guo, Y.; Ma, L.; Cheng, Y. Preparation, characteristics and antioxidant activity of polysaccharides and proteinscapped selenium nanoparticles synthesized by *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Carbohydr. Polym.* **2018**, 195, 576–585.
68. Bettaib, J.; Talarmin, H.; Kalai, F.Z.; Giroux-Metges, M.-A.; Ksouri, R. Limoniastrum guyonianum prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in IEC-6 cells by enhancing enzymatic defense, reducing glutathione depletion and JNK phosphorylation. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, 95, 1404–1411.
69. Mou, K.; Pan, W.; Han, D.; Wen, X.; Cao, F.; Miao, Y.; Li, P. Glycyrrhizin protects human melanocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage via the Nrf2-dependent induction of HO-1. *Int. J. Mol. Med.* **2019**, 44, 253–261.
70. Franco, M.E.; Sutherland, G.E.; Lavado, R. Xenobiotic metabolism in the fish hepatic cell lines Hepa-E1 and RTH-149, and the gill cell lines RTgill-W1 and G1B: Biomarkers of CYP450 activity and oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2018**, 206–207, 32–40.
71. Bopp, S.K.; Abicht, H.K.; Knauer, K. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquat. Toxicol.* **2008**, 86, 197–204.

72. Uçar, A.; Parlak, V.; Özgeri, F.B.; Yeltekin, A.Ç.; Alak, G.; Atamanalp, M. Determination of Fipronil toxicity by different biomarkers in gill and liver tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vitr. Cell. Dev. Biol.–Anim.* **2020**, *56*, 543–549.
73. Banaee, M. Chapter 4. Physiological Dysfunction in Fish after Insecticides Exposure. In *Insecticides Development of Safer and More Effective Technologies*, 1st ed.; Trdan, S., Ed.; IntechOpen: London, UK, **2013**; pp. 103–142. ISBN 978-953-51-5348-1.
74. Tkachenko, H.; Kurhaluk, N.; Grudniewska, J.; Andriichuk, A. Tissue-specific responses of oxidative stress biomarkers and antioxidant defenses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during a vaccination against furunculosis. *Fish Physiol. Biochem.* **2014**, *40*, 1289–1300.
75. Dawood, M.A.O.; Zommara, M.; Eweedah, N.M.; Helal, A.I.; Aboel-Darag, M.A. The potential role of nano-selenium and vitamin C on the performances of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27*, 9843–9852.
76. Harsij, M.; Kanani, H.G.; Adineh, H. Effects of antioxidant supplementation (nano-selenium, vitamin C and E) on growth performance, blood biochemistry, immune status and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under sub-lethal ammonia exposure. *Aquaculture* **2020**, *521*, 734942.
77. Neamat-Allah, A.N.F.; Mahmoud, E.A.; Abd El Hakim, Y. Efficacy of dietary Nano-selenium on growth, immune response, antioxidant, transcriptomic profile and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* against *Streptococcus iniae* infection. *Fish Shellfish Immunol.* **2019**, *94*, 280–287.
78. Dalmo, R.A.; Ingebrigtsen, K.; Bøgwald, J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *J. Fish Dis.* **1997**, *20*, 241–273.
79. Rodríguez, A.; Esteban, M.Á.; Meseguer, J. Phagocytosis and peroxidase release by seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes in response to yeast cells. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* **2003**, *272A*, 415–423.
80. Dawood, M.A.O.; Zommara, M.; Eweedah, N.M.; Helal, A.I. Synergistic Effects of Selenium Nanoparticles and Vitamin E on Growth, Immune-Related Gene Expression, and Regulation of Antioxidant Status of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biol. Trace Elem. Res.* **2019**, *195*, 624–635.



81. Xia, I.F.; Cheung, J.S.; Wu, M.; Wong, K.-S.; Kong, H.; Zheng, X.; Ka-Hing Wong, K.-H.; Kwok, K.W. Dietary chitosan-selenium nanoparticle (CTS-SeNP) enhance immunity and disease resistance in zebrafish. *Fish Shellfish Immunol.* **2019**, *87*, 449–459.
82. Longbaf Dezfouli, M.; Ghaedtaheri, A.; Keyvanshokoo, S.; Salati, A.P.; Mousavi, S.M.; Pasha-Zanoosi, H. Combined or individual effects of dietary magnesium and selenium nanoparticles on growth performance, immunity, blood biochemistry and antioxidant status of Asian seabass (*Lates calcarifer*) reared in freshwater. *Aquac. Nutr.* **2019**, *25*, 1422–1430.
83. Sattin, G.; Bakiu, R.; Tolomeo, A.M.; Carraro, A.; Coppola, D.; Ferro, D.; Patarnello, T.; Santovito, G. Characterization and expression of a new cytoplasmic glutathione peroxidase 1 gene in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Hydrobiologia* **2015**, *761*, 363–372.
84. Tollerz Bratteby, U. Factors Explaining Variation in the Fecundity of Female Baltic Salmon (*Salmo salar*)—The Influence of Length, Body Condition and Growth Rate at Sea. Master's Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Öregrund, Sweden, **2019**.
85. Rautela, A.; Rani, J.; Das, M.D. Green synthesis of silver nanoparticles from *Tectona grandis* seeds extract: Characterization and mechanism of antimicrobial action on different microorganisms. *J. Anal. Sci. Technol.* **2019**, *10*, 5.
86. Fang, X.; Wang, Y.; Wang, Z.; Jiang, Z.; Dong, M. Microorganism Assisted Synthesized Nanoparticles for Catalytic Applications. *Energies* **2019**, *12*, 190.

## CAPÍTULO IV: OBJETIVOS ESPECÍFICOS 3 Y 4

### SELENIUM NANOPARTICLE-ENRICHED AND A POTENTIAL PROBIOTIC, THE STRAIN *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* S14 AS NUTRITIONAL SUPPLEMENT TO IMPROVE PHYSIOLOGICAL AND PRODUCTIVE PARAMETERS OF RAINBOW TROUT

**Artículo publicado:** *Biology* **2022**, 11, 1523. <https://doi.org/10.3390/biology11101523>

**Francisco Yanez-Lemus**<sup>1,2</sup>, Rubén Moraga<sup>3</sup>, Carlos T. Smith<sup>1</sup>, Paulina Aguayo<sup>1,4,5</sup>, Kimberly Sánchez-Alonzo<sup>6</sup>, Apolinaria García-Cancino<sup>6</sup>, Ariel Valenzuela<sup>7</sup> and Víctor L. Campos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Environmental Microbiology Laboratory, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Universidad de Concepcion, Concepcion 4070386, Chile; franciscoyanez@udec.cl (F.Y.-L.); csmith@udec.cl (C.T.S.); paulinaaguayo@udec.cl (P.A.)

<sup>2</sup>Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Recursos Naturales y Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Chile; franciscoyanez@santotomas.cl (F.Y.-L.)

<sup>3</sup>Microbiology Laboratory, Faculty of Renewable Natural Resources, Arturo Prat University, Iquique 1100000, Chile; rmoraga@unap.cl

<sup>4</sup>Faculty of Environmental Sciences, EULA-Chile, Universidad de Concepcion, Concepcion 4070386, Chile

<sup>5</sup>Institute of Natural Resources, Faculty of Veterinary Medicine and Agronomy, Universidad de Las Américas, Sede Concepcion, Chacabuco 539, Concepcion 3349001, Chile

<sup>6</sup>Laboratory of Bacterial Pathogenicity, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Universidad de Concepcion, Concepcion 4070386, Chile; kimsanchez@udec.cl (K.S.-A.); apgarcia@udec.cl (A.G.-C.)

<sup>7</sup>Laboratory of Pisciculture and Aquatic Pathology, Department of Oceanography, Faculty of Natural and Oceanographic Sciences, Universidad de Concepcion, Concepcion 4070386, Chile; avalenz@udec.cl

\* Correspondence: vcampos@udec.cl; Tel.: +56-41-2204144

## Abstract

Lactic acid bacteria (LAB), obtained from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine, were cultured in MRS medium and probiotic candidates concurrently producers of elemental selenium nanoparticles (Se<sup>0</sup>Nps) were selected. Probiotic candidates were subjected to morphological characterization and the following tests: antimicrobial activity, antibiotic susceptibility, hemolytic activity, catalase, hydrophobicity, viability at low pH and tolerance to bile salts. Two LAB strains (S4 and S14) satisfied the characteristics of potential probiotics, but strain S14, reduced selenite to biosynthesize Se<sup>0</sup>Nps. S14 strain was identified, by 16S *rDNA* analysis, as *Lactiplantibacillus plantarum*. Electron microscopy showed Se<sup>0</sup>Nps measuring 98 to 245 nm on the surface of S14 strain cells. Rainbow trout diet was supplemented (10<sup>8</sup> CFU g<sup>-1</sup> feed) with Se<sup>0</sup>Nps-enriched *Lp. plantarum* S14 (LABS14-Se<sup>0</sup>Nps) or *Lp. plantarum* S14 alone (LABS14) for 30 days. At days 0, 15 and 30 samples (blood, liver and dorsal muscle) were obtained of both groups, plus controls lacking diet supplementation. Diet supplementation with LABS14-Se<sup>0</sup>Nps significantly improved fish plasma lysozyme, respiratory burst (innate immune response) and tissular glutathione peroxidase (oxidative status) activities and productive parameters of *O. mykiss* when compared to fish supplemented with LABS14 and controls. Therefore, Se<sup>0</sup>Nps-enriched *Lp. plantarum* S14 may be a promising alternative for rainbow trout nutritional supplementation.

**Keywords:** nutritional supplement, probiotic, selenium nanoparticles, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, ROS, lysozyme, oxidative stress, production parameters

## 1. Introduction

Chile is a well-known and competitive salmon and trout producer. In fact, as examples, it is the world's second largest aquacultured Atlantic salmon (*Salmo salar*) producer after Norway [1] and the main producer of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the world [2]. This high productivity requires intensive farming, i.e., massive fish biomass grown at high densities per unit of water volume, resulting in an increased fish susceptibility to diseases caused by various microbial pathogens, including bacteria [3]. Controlling bacterial fish diseases has been associated to an increased use of antibiotics and chemotherapeutics, leading to drug resistant pathogens. According to the official 2017 Aquaculture Environmental Report [4], the production

of salmonids has caused the accumulation of organic matter (e.g., uneaten food, fish's feces) and antibiotics in the in the sediment of sea, fjords or lakes located directly beneath the fish cages. Urbina [5] reported a localized eutrophication and changes in overall microbial biodiversity in the sediments of different salmon culture centers in southern Chile. Cabello & Godfrey [6] suggested that the excessive use of antimicrobials in the Chilean salmon farming industry and that the presence of antimicrobial residues in the environment is creating a critical condition which is generating and disseminating new antimicrobial resistance genes among bacterial populations, with potentially negative effects on fish farming and human health.

The main antibiotics used in aquacultured salmonid fish are florfenicol and oxytetracycline. According to the Chilean governmental National Service of Fishing and Aquaculture (Sernapesca), during the 2017-2020 period, oxytetracycline and florfenicol represented 16.63% and 79.62% respectively, of all the antibiotics used in Chilean aquaculture [7]. Navarrete *et al.* [8] showed that oxytetracycline decreases bacterial diversity in the salmonid microbiota, facilitating the proliferation of opportunistic pathogenic bacteria. Donati *et al.* [9] reported that after 10 days of florfenicol dietary treatment, rainbow trout underwent a shift in the relative abundance, at the phylum level, of their intestinal microbiome including an increase of *Proteobacteria* and a reduction of *Firmicutes* when compared to the control. Previously, Valdes *et al.* [10] had already demonstrated by metagenomic analysis that rainbow trout with an intestinal dysbiosis, with an increase of members of the *Proteobacteria* phylum and a reduction of members of the *Firmicutes* phylum showed a higher susceptibility to flavobacteriosis, a freshwater disease caused by the Gram-negative bacterium *Flavobacterium psychrophilum*. Therefore, alternatives to reduce the use of these antibiotics are necessary.

The role of the intestinal microbiota in fish seems to be similar to that of terrestrial mammals; that is to say, it reinforces the digestive and immune systems [11], promotes growth performance and alleviates oxidative stress (OS) caused by toxic pollutants, such as the heavy metal cadmium (Cd) [12]. In fish, the imbalance of the intestinal microbiota is one of the most relevant consequences of the misuse of antimicrobials. This imbalance may lead to the colonization or the overgrowth of opportunistic pathogenic bacteria, increasing fish mortality [13].

A number of alternatives to the use of antibiotics in salmonid farming are available (Lozano *et al.*, 2017). Among these alternatives, probiotics, "live microorganisms which when

administered in adequate amounts confer a health benefit on the host” [14], have been credited for improving nutrition, provide health benefits, reduce the incidence of diseases, improve growth, health status, immunity, feed conversion, microbial balance, and water quality, as well as food production in an environmental-friendly manner [15, 16]. The supplementation of food with probiotics can be also used to control several bacterial pathogens in various fish species [17], including rainbow trout [15]. The beneficial effects of probiotics producing lactic acid on various aquacultured species has been previously reported [18, 19, 20].

Lactic acid bacteria (LAB) are Gram-positive bacteria which include non-spore forming cocci or coccobacilli, anaerobe or facultative anaerobe rods that produce organic acids, such as lactic acid which is the main fermentation product of carbohydrate metabolism [21]. Some LAB bacterial strains, due to their capability to produce bioactive compounds (such as lactic acid, acetate acid, formic acid, hydrogen peroxide, ethanol, enzymes, benzoate, antimicrobial peptides, free fatty acids, and volatile compounds), can work synergistically as broad-spectrum antimicrobials toward several pathogens and exert a probiotic activity [22].

Members of bacterial genera which have been investigated as probiotics in salmonid fish include *Carnobacterium*, *Pediococcus* and *Lactobacillus*, which are LAB belonging to phylum *Firmicutes* [23]. Certain strains of *Lactiplantibacillus plantarum* (formerly *Lactobacillus plantarum*) have demonstrated probiotic properties [24] which have boosted the immune status and growth when supplemented to the diet in different fish species, such as Atlantic salmon [25] and rainbow trout [26, 27].

On the other hand, Selenium (Se) is an essential element for animals. It participates in metabolic processes involved in development, growth, health, and fertility and it is administered to cultured salmon and trout as a nutritional supplement [28, 29]. Se is a cofactor of multiple proteins (seleno-proteins) which contribute to remove reactive oxygen species (ROS), preventing OS [30]. According to Rathore *et al.* [31], the elemental Se nanoparticles (Se<sup>0</sup>Nps) can be effectively used as a growth promoter, antioxidant, and immunostimulant agent in aquacultured species. Numerous other studies also reported the benefit of including Se<sup>0</sup>Nps to the diet of aquatic animals to enhance their growth performance, and their physiological and health condition [32-34]. Se<sup>0</sup>Nps are characterized by their low toxicity and high functionality [35]. Markedly, when compared to other forms of Se, the inclusion of Se<sup>0</sup>Nps as food

supplement have proven to better enhance growth performance and productivity in aquatic animals [36].

Since bacteria can grow rapidly, are easy to manipulate and can be cultured at a relatively low cost, they can be used as micro-factories capable to biosynthesize, among other compounds, metal nanoparticles [37]. Due to its easy processing, low environmental impacts, and high pharmacological merits, the production of Se<sup>0</sup>Nps by bacteria has become an extensively validated method [38]. A number of LAB have been investigated as Se-enriched (i.e. bacteria capable to produce Se<sup>0</sup>Nps) food supplement applications [39]. Some strains of *Lp. plantarum* have demonstrated to be able to accumulate Se salts and to biotransform amino acids into seleno-amino acids or Se<sup>0</sup>Nps [40-42]. A Se-enriched *Lp. plantarum* supplemented diet has shown to protect against Cd toxicity, reducing OS in the fish *Luciobarbus capito* [43] and having anti-inflammatory and immunomodulatory effects in mice [44].

Considering the benefits that probiotics on one hand and of Se<sup>0</sup>NPs on the other hand can provide to the salmonid farming industry, this study aimed firstly to isolate and select, from the intestinal content of rainbow trout, a suitable lactic acid bacterial strain possessing characteristics of a probiotic and concurrently being able to produce Se<sup>0</sup>Nps and then to evaluate, *in vivo*, its possible positive effect, when administered as a diet nutritional supplement, on innate immune response, the oxidative status, and productive parameters of *O. mykiss*.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Animals used**

All rainbow trout (*O. mykiss*) used in this study were treated in accordance with the Biosecurity Regulations and Ethical Protocols approved by the University of Concepcion (UdeC) Ethics Committee (protocol code CBB 1084-2021). A total of 108 apparently healthy rainbow trout were used in this study. All fish were obtained from Salmones Pangue fish farm (Florida, BioBio Region, Chile). Fish were transported from the fish farm to the UdeC facilities (approximately 25 km distance) considering the guidelines for welfare of farmed fish during transport included in the Aquatic Animal Health Code [45].

The plan to be accomplished in the present study firstly included to isolate putative LAB from the intestinal content of 6 fish to search for isolates showing characteristics of potential

probiotics and also the ability to produce Se<sup>0</sup>Nps. Then, considering its probiotic potential and Se<sup>0</sup>Nps production, a selected isolate was to be selected to be dispensed, as a food supplement, to rainbow trout to evaluate, *in vivo*, its effect on the innate immune response, the oxidative status, and productive parameters of *O. mykiss*. The *in vivo* work plan required a total of 102 fish (96 fish required for the *in vivo* trials plus 6 additional spare fish).

## 2.2. Obtention of putative LAB isolates from the intestinal content of rainbow trout

Six fish (average weight 105.7 ± 3.2 g) were transported to the Laboratory of Environmental Microbiology (LEM), UdeC, where they were euthanized using an overdose (50 ppm) of BZ-20 (sodium para-aminobenzoate) anesthetic (Veterquímica, Santiago, Chile) following indications given by the American Veterinary Medical Association (AVMA) guidelines for the euthanasia of animals [46]. Then, their intestines were aseptically removed, the intestinal content of the 6 fish mixed and homogenized. One g of this homogenate was suspended in 9 mL sterile saline solution, vigorously vortexed by at least 2 min and then transferred to a 15 mL Falcon tube (Corning Inc, Tewksbury, USA). Then, 100 µL of serial dilutions (10<sup>-1</sup> to 10<sup>-7</sup>) were spread on plates containing Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (Merck, Darmstadt, Germany), a culture medium specially designed to allow the growth of most LAB strains [47], and then incubated under microaerobic condition at 37°C for 48 h using the candle jar method [48]. For the identification of colonies as LAB, the macroscopic morphological characterization of colonies was analyzed, and the Gram staining and catalase test were used. Gram-positive and catalase negative colonies were selected for carbohydrate fermentation tests. Each colony that showed a carbohydrate fermentative metabolism was considered a LAB isolate [49, 50]. The experiments were carried out in triplicate.

## 2.3. Search for isolates from the intestinal content of rainbow trout having characteristics of LAB

### 2.3.1. Morphological characterization of isolates

The morphology of each colony (hereafter referred as isolate) was done visually in pure cultures in Petri dishes as described by Procop *et al.* [51]. These observations included shape, color, edges, and elevation of the colonies. Observation of bacterial cells was performed, after Gram staining, under a light microscope (Olympus CX31, Tokyo, Japan), in order to select the Gram-positive isolates [52].

### 2.3.2. Catalase test

Catalase test was conducted by dripping two drops of 3% hydrogen peroxide on an object glass slide in which each isolate from a 24-48 h culture at 37°C under microaerobic conditions was previously spread. A catalase positive test is characterized by the formation of oxygen bubbles resulting from the activity of the bacterial catalase enzyme which converts H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into water and oxygen (O<sub>2</sub>) [53]. The experiments were carried out in triplicate.

### 2.3.3. Carbohydrate fermentation tests

Carbohydrate fermentation tests were done according to Erkus [54] with modifications. Briefly, 6 sugar substrates: 3 hexoses (glucose, fructose, and galactose) and 3 pentoses (ribose, xylose and arabinose) (Merck, Darmstadt, Germany) were used. Every sugar was dissolved in deionized water at a final concentration of 5% (w/v), and sugar solutions sterilized using 0.22 µm pore diameter sterile syringe filters (Thermo Fisher Scientific, Göteborg, Sweden). MRS broth plus 0.01 g phenol red (Merck, Darmstadt, Germany) per L of broth, as pH indicator, was prepared. Then, 4.5 mL of MRS broth plus phenol red were placed into screw cap test tubes and after placing Durham's tubes they were autoclaved at 121° C for 15 min. Different sugar sterile solutions (0.5 mL) were added to different test tubes and 200 µL of each isolate (previously adjusted to 0.5 McFarland) were inoculated into the MRS broth containing phenol red. Incubation was performed under microaerobic condition at 37° C for 24-48 h. Carbohydrate fermentation was detected by the color change of the medium and gas formation was detected in the Durham tubes [54].

## 2.4. Search for potential probiotic characteristics in the isolated LAB strains

The isolates classified as LAB strains were tested to determine, according to Rondón *et al.* [55], if they possessed characteristics of potential probiotics. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility, viability at a low pH, tolerance to bile salts, hemolytic activity and hydrophobicity assays of isolates were evaluated. The experiments were carried out in triplicate.

### 2.4.1. Antimicrobial activity of the LAB strains

Isolates were individually screened to detect their antibacterial activity against indicator bacteria including both Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 strains) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922 and



*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 strains) according to Schillinger & Lücke [56] and Geria *et al.* [57] with modifications. Briefly, each LAB strain, adjusted to 0.5 McFarland, was individually sown by swabbing on Petri dishes containing a thin layer of MRS agar and then 4 mm in diameter discs were aseptically removed. One disc of each LAB strain was placed on top of Trypticase Soy Agar (TSA) (Merck, Darmstadt, Germany) containing Petri dishes in which the indicator bacteria (adjusted to 0.5 McFarland) had been previously sown. Finally, the Petri dishes were incubated at 37 °C for 24-48 h under microaerobic conditions. Diameters of inhibition halos observed were measured and registered. The absence of inhibition halo was interpreted as negative antibacterial activity [58]. LAB strains and indicator bacteria were also separately cultured under similar conditions as growth controls. The experiments were carried out in triplicate

#### *2.4.2. Antibiotic susceptibility test of the LAB strains*

Phenotypic susceptibility of LAB strains to antibiotics was determined using the agar diffusion method according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [59]. Susceptibility to the following antimicrobials was tested: gentamicin (GEN; 10 µg), tetracycline (TET; 30 µg), oxytetracycline (OXY; 30 µg), erythromycin (ERY; 15 µg), florfenicol (FLO; 30 µg) and ampicillin (AMP; 10 µg) (Oxoid, Hampshire, United Kingdom). Briefly, each LAB strain was grown in MRS broth at 37 °C for 18 h under microaerobic conditions from which a 0.5 McFarland inoculum was prepared. Then, 100 µL of cell suspension were evenly spread on a Mueller-Hinton agar (Merck, Darmstadt, Germany) containing plate and maintained at room temperature for 1 h. The standard antibiotic discs were aseptically placed on the plates and incubated at 37 °C for 24–72 h under microaerobic condition. Antimicrobial susceptibility was interpreted according to the inhibition diameter disc diffusion breakpoint proposed by the CLSI [59] (Table 1). The experiments were carried out in triplicate.

**Table 1.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing by the disc diffusion antibiotic method [59] and classification of antibiotics [60] used in this study.

Antibiotic ( $\mu\text{g}$ )	Interpretive categories and inhibition diameter			Antibiotic class	Mechanism of action
	breakpoints, nearest whole mm				
	S	I	R		
GEN (10)	$\geq 15$	14-13	$\leq 12$	Aminoglycosides	Inhibitor of protein synthesis
TET (30)	$\geq 15$	14-12	$\leq 11$	Tetracycline	Inhibitor of protein synthesis
OXY (30)	$\geq 15$	14-12	$\leq 11$	Tetracycline	Inhibitor of protein synthesis
ERY (15)	$\geq 22$	21-16	$\leq 15$	Macrolides	Inhibitor of protein synthesis
FLO (30)	$\geq 19$	18-15	$\leq 14$	Amphenicols	Inhibitor of protein synthesis
AMP (10)	$\geq 17$	16-14	$\leq 13$	B-Lactams	Inhibitor of the cell wall synthesis

GEN: gentamicin; TET: tetracycline; OXY: oxytetracycline; ERY: erythromycin; FLO: florfenicol; AMP: ampicillin. S: susceptible; I: intermediate; R: resistant.

### 2.4.3. Hemolytic activity of the LAB strains

To determine the hemolytic activity of the LAB strains, the method described by Rodrigues *et al.* [61], with modifications, was used. Briefly, bacteria from an axenic and fresh culture were sown on MRS agar containing 5% human blood. The plates were then incubated at 37 °C for 24, 48 or 72 h under microaerobic conditions, after which alpha, beta or gamma hemolysis around each colony was determined. *S. aureus* ATCC 6538 was used as a positive control. The experiments were carried out in triplicate.

### 2.4.4. Hydrophobicity assays. Microbial adhesion to hydrocarbons (MATH) of the LAB strains

To determine the hydrophobicity of the LAB strains, the MATH method by Xu *et al.* [62] with modifications, was used. Briefly, 2 mL of a bacterial suspension of each LAB strain adjusted to 0.5 McFarland was mixed with 0.8 mL of p-xylene (1,4-dimethylbenzene; Merck, Darmstadt, Germany) and vortexed for 2 min. Samples were maintained at room temperature and the phases allowed to separate by decantation. The aqueous phase was carefully removed. The decrease in the absorbance of the aqueous phase, at an optical density (OD) of 600 nm, was taken as a measure of the cell surface hydrophobicity (H%), which was calculated using the formula:

$$H\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

Where  $A_0$  and  $A$  are the absorbances before and after extraction with p-xylene, respectively. The experiments were carried out in triplicate.

According to Sánchez-Ortiz *et al.* [63], H% values <30% were considered as “Low”, values ≥30% and <60% were referred as “Medium” and values ≥60% were referred as “High”. Strains with low adhesion to p-xylene (<30%) were discarded as potential probiotics.

### 2.4.5. Cell viability of the LAB strains at a low pH or bile salts

The tolerance of the selected LAB strains to acidic pH or bile salts was determined based on the methodology of Kaushik *et al.* [64] and Klayraung & Okonogi [65], respectively with modifications. Briefly, 1 mL of bacterial culture was grown in 9 mL MRS broth adjusted to pH 3 using 5N HCl (Merck, Darmstadt, Germany) or supplemented with 0.3% bile salts (Ox-

bile dehydrated and purified salt for microbiology, Merck, Darmstadt, Germany) [66] at 37° C for 4 h under microaerobic conditions. Then, aliquots were transferred to plates containing MRS agar and incubated at 37°C for 48 h under microaerobic conditions and counts expressed as log CFU mL<sup>-1</sup>. LAB strains cultured under similar conditions but not subjected to the low pH or bile salts were used as controls. The viability of LAB strains in the presence of acidic pH or bile salts was expressed as percentage of viable cells with respect to the control, according to the formula:

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{Number of CFU LAB strain in MRS exposed low pH or bile salts}}{\text{Number of CFU LAB strain in MRS not exposed to low pH or bile salts}} \times 100$$

A LAB strain was considered as tolerant to low pH or bile salts if counts of CFU mL<sup>-1</sup> of the LAB strain cultured under low pH or bile salts was higher than 50% counts of CFU mL<sup>-1</sup> of the respective control. The experiments were carried out in triplicate

#### 2.5. Biosynthesis and characterization of Se<sup>0</sup>Nps-enriched probiotic strain (LABstrain-Se<sup>0</sup>Nps)

The LAB strains that showed the most promising characteristics of a potential probiotic bacterium according to Rondón *et al.* [55] were individually cultured in MRS agar containing 1 mM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> at 37°C for 24 h under microaerobic condition [48]. Colonies which acquired a red color, a characteristic feature of the allotropic form of the Se<sup>0</sup> [67], were transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes (Merk, Darmstadt, Germany) containing 500 µL sterile distilled water and then centrifuged at 10,000 g for 10 min in a Universal 320 | 320 R centrifuge (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany). The supernatants of each tube were discarded, and the pellets washed three times using 500 µL sterile distilled water. After the last wash, distilled water was discarded and replaced by 500 µL 2.5% glutaraldehyde (Merck, Darmstadt, Germany) in cacodylate buffer [68]. Samples were processed at the Laboratory of Electron Microscopy (UdeC) for characterization by Transmission Electron Microscopy (TEM) as described by Dhanjal & Cameotra [69] using a JEOL JSM 1200EX-II TEM microscope (JEOL, Massachusetts, USA) and Scanning Electron Microscopy (SEM) for their visualization and SEM-Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (SEM-EDS) for their chemical characterization, as described by Torres *et al.* [70], using a JEOL JSM 6380LV SEM microscope (JEOL, Massachusetts, USA). The experiments were carried out in triplicate.

## 2.6. DNA isolation, 16S rDNA gene amplification and sequencing of LAB strain-*Se<sup>0</sup>Nps*

DNA was extracted from each LAB strain using the DNeasy UltraClean Microbial kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's indications. Bacterial DNA of each isolate was amplified by PCR according to a method described by Wang *et al.* [71] using 16S rDNA universal primers GM3f (5'-AGAGTTTGATCMTGGC-3') and GM4r (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') [72]). PCR products were sequenced by the Sanger's method using an ABI PRISM 3500 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequencing was done at Genoma Mayor, Universidad Mayor, Santiago, Chile. The sequences were analyzed by means of Basic Local Alignment Search Tools (BLAST).

## 2.7. Effects of the LAB strain-*Se<sup>0</sup>Nps* dietary supplementation on the innate immune response, the oxidative status, and productive parameters of rainbow trout

### 2.7.1. Rainbow trout rearing conditions and experimental design

One hundred and two fish were transported from Salmones Pangué to an environmentally controlled semi-closed recirculation system at the Laboratory of Pisciculture and Aquatic Pathology (LPAP), Faculty of Natural and Oceanographical Sciences, UdeC, Concepción, Chile. The 102 fish were kept in fiberglass tanks at a density of 25 kg fish m<sup>-3</sup> under a 12:12 light:dark photoperiod [73]. The water quality parameters were monitored and recorded daily during all the time fish were maintained at the LPAP (up to 51 days). The daily average of the parameters was, temperature: 14.9 ± 1.3°C, dissolved oxygen: 8.3 ± 0.12 mg L<sup>-1</sup>, ammonia (total ammonia nitrogen ≤ 0.1 mg L<sup>-1</sup>), nitrite (≤ 0.2 mg L<sup>-1</sup>) and pH: 7.6 ± 0.7 (values ± correspond to the maximum daily variation recorded).

Rainbow trout were maintained during a 21-day acclimation period at the LPAP facilities before starting the assays. During adaptation, fish received a commercial extruded food acclimation diet (AD) (Cargill-Ewos, Coronel, Chile). The AD contained 39-43% crude protein, 10-16% lipids 3-4% fiber, 9-12% ash, 7-13% moisture, 1-2% calcium and 1-1.4% phosphate. Fish were fed twice daily (10:00 h and 16:00 h), receiving 2% of their average body weight per day. Eight fish per tank were randomly weighed (BLC 1500 scale, Boeco, Hamburg, Germany) at the beginning of the feeding trial and subsequently when samples for the assays were taken, and the amount of food supplied adjusted accordingly. After the adaptation period, fish were randomly distributed in 6 tanks (17 fish per tank) and were fed, for 30 days, with

either of two experimental diets or with a control diet. Diet D1 corresponded to AD plus the LAB strain selected for having properties of a probiotic and producer of Se<sup>0</sup>Nps when cultured in the presence of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. Diet D2 was similar to D1 except that the selected bacterial strain was cultured in the absence of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> to avoid the presence of Se<sup>0</sup>Nps. The control diet was the same as AD.

### *2.7.2. Preparation of diets*

The LAB strain selected to enrich D1 and D2 was cultured in MRS broth with or without 1 mM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, respectively, with agitation (100 rpm) in 2,000 mL Erlenmeyer flasks (Merck, Darmstadt, Germany) at 37°C for 24 h under microaerobic condition. Then, cultures were transferred to 50 mL conical Falcon centrifuge tubes and centrifuged at 10,000 g for 10 min in a Universal 320 | 320 R centrifuge. The supernatant of each tube was discarded, and the pellet was washed thrice using 500 µL sterile distilled water. After the last wash, distilled water was discarded and replaced by sterilized saline solution at a 1 : 4 (pellet : saline solution) ratio.

To prepare the live spray diets D1 and D2, 10<sup>8</sup> CFU LAB strain per g of dry AD was used as indicated by Vera [74]. All diets were prepared weekly. Care was taken to maintain sterile conditions through all procedures. The stock diets were kept at 20 ± 2 °C. The viability of the incorporated LAB strain was evaluated vortexing 10 g of D1 and D2 diets in 90 mL of peptone water and preparing serial dilutions, whereupon 0.1 mL aliquots were spread, by triplicate, on plates containing MRS agar and then incubated at 37°C under microaerobic conditions for 48 h. Then CFU were count.

### *2.7.3. Rainbow trout sampling*

On days 0, 15 and 30, six fish from each experimental or control group were carefully captured from the tanks at the LPAP and anesthetized by immersion in fresh water containing 50 ppm of BZ-20 (sodium para-aminobenzoate) anesthetic (Veterquimica, Santiago, Chile) until a surgical anesthesia or stage III anesthesia in fish were observed (total loss of equilibrium and reactivity but opercular movement present) [75, 76]. Then, rainbow trout were individually weighted in a BLC 1500 scale and measured from the tip of the snout to the rear edge of the fork at the center of the tail fin. Blood was extracted from the caudal vein of each fish, by means of a heparinized 18G needle fitted to a 5 mL syringe and transferred to sterile microtubes containing 0.02 mL of 1,000 U mL<sup>-1</sup> heparin sodium salt (Merck, Darmstadt,

Germany). Once blood was obtained, each sampled fish was humanely euthanized, as described in section 2.2. Sampling of liver and dorsal muscle of rainbow trout were carried out on day 30 of experimentation after the euthanasic procedure was concluded. The samples of blood, liver and dorsal muscle were immediately transported, at 4°C, to the LEM, UdeC, (distant approximately 400 m). Blood obtained from each fish was divided into 2 parts, one was used to isolate white blood cells (WBC), as described by Hu *et al.* [77] and the other to obtain plasma by centrifugation at 5,000 g for 10 min. Liver and dorsal muscle were fragmented. Then, plasma, liver and dorsal muscle were stored at -80°C. WBC were used to determine ROS concentration immediately after being obtained.

#### 2.7.4. Evaluation of ROS in WBC and lysozyme activity in plasma

ROS concentration in WBC and plasma lysozyme activity of six rainbow trout per sampling day and diet were measured. For ROS concentration measurements, an assay evaluating the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) into spectrophotometrically measurable colored formazan by oxidizing agents was used following the method of Anderson & Siwicki [78]. Briefly, 100 µL of the WBC suspension in Ringer's solution from each experimental or control fish containing  $1 \times 10^7$  WBC mL<sup>-1</sup> were incubated in Eppendorf tubes, with 100 µL 0.1% NBT (Merck, Darmstadt, Germany) for 60 min. Later on, 1 mL N,N-dimethylformamide (Merck, Darmstadt, Germany) was added and the Eppendorf tubes centrifuged for 10 min at 100 g. Absorbance of the supernatant was measured at 620 nm wavelength in an Epoch spectrophotometer.

In order to determine plasma lysozyme activity level, a turbidimetric assay was used [79]. Briefly, after plasma was thawed on ice 950 µL of buffered substrate (0.25 mg of *Micrococcus lysodeikticus* in 1 mL of buffered 40 mM sodium phosphate pH 6.2) was mixed with 50 µL of fish plasma. The absorbance of this suspension was measured at 450 nm wavelength by means of an Epoch spectrophotometer immediately after adding plasma (time 0) and after 30 min. A  $0.001 \text{ min}^{-1}$  absorbance reduction was evaluated as one unit of lysozyme activity [79]. ROS in WBC and plasma lysozyme activity measurements were carried out in triplicate.

### 2.7.5. Activity of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (Gpx) in plasma, liver and dorsal muscle

The glutathione peroxidase (Gpx) activity was measured in plasma according to Lawrence & Burk [80] and in liver and dorsal muscle as described by Fontagné-Dicharry *et al.* [81]. Gpx activity in plasma samples was evaluated immediately after thawing. In the case of liver and muscle, samples were thawed on ice and homogenized in 10 volumes (w/v) of ice-cold saline for 3 min and centrifuged for 15 min at 4,000 g and the supernatants collected to evaluate the activity of GPx. GPx activity was measured in a solution of 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), 1 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Germany), 2 mM sodium azide (Merck, Darmstadt, Germany), 2 mM reduced glutathione (GSH) (Merck, Darmstadt, Germany), 0.1 mM NADPH (Merck, Darmstadt, Germany) and 0.2 mM glutathione reductase (Merck, Darmstadt, Germany). The reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50µM) at 30°C was measured at 340 nm wavelength in an Epoch spectrophotometer. One unit of Gpx activity corresponds to 1 mol NADPH consumed per min per mg of plasma protein, using the appropriate molar absorptivity coefficient for NADPH (6220 mol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Plasma proteins were measured by the method of Lowry *et al.* [82].

### 2.7.6. Effect of diets on trout growth performance and survival rate

On day 30, the effects of D1 or D2, in comparison to AD (control), on the productive parameters of the fish were evaluated. Weight and length of each trout and the number of dead fish were recorded to calculate the specific growth rate (SGR), weight gain (WG), condition factor (CF) and survival percentage, according to Naderi *et al.* [83] and Lugert *et al.* [84], using the following formula:

$$SGR (\% \text{ increase body wt } d^{-1}) = \left[ \frac{(\ln w_2 - \ln w_1)}{\text{days}} \right] \times 100$$

$$WG (g) = w_2 - w_1$$

$$CF = \left[ \frac{W}{L^3} \right] \times 100$$

$$\text{Survival rate } (\%) = \left[ \frac{n_2}{n_1} \right] \times 100$$

where w<sub>1</sub> = starting weight (g); w<sub>2</sub> = final weight (g); days = days in the growth period; w = weight (g); L = length (cm); n<sub>1</sub> = initial number of fish; n<sub>2</sub> = final number of fish.



When the D1, D2 and AD groups were made up, the initial condition factor (ICF) was considered (similar sizes and weights) to make sure that the initial populations of each group were homogeneous with respect to the development stage and the nutritional condition.

## 2.8. Statistics

One-way analysis of variance (ANOVA) associated to a power and sample size test followed by a Fisher's least significant difference (LSD) multiple comparison test was used to determine the statistical significance for multiple comparisons. The student's t-test was used for pairwise comparisons. Values of  $p < 0.05$  were considered as statistically significant. All statistical tests were performed using the GraphPad Prism software version 7 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## 3. Results

### 3.1. Isolation of LAB

Culturable bacteria from the intestinal content of 6 apparently healthy rainbow trout were obtained in MRS agar medium. After 12 h of incubation at 37°C under microaerobic condition, colonies were visible in all agar plates. After 48 h of incubation, 16 colonies were observed, being slightly white, convex, circular, with defined edges, 2 to 5 mm in diameter and creamy consistency. Each colony was collected and individually referred as S1 to S16 isolate. After light microscopy observations (Gram staining) and catalase test were performed to the 16 isolates, 6 rod-shaped Gram-positive and catalase negative isolates were selected (S2, S4, S8, S12, S13 and S14) (Table 2) and then they were subjected to the carbohydrate fermentation test by each isolate and the results are displayed in Table 3. From these findings, isolates S2, S4, S8, S12, S13 and S14 isolates were considered as LAB strains.

**Table 2.** Morphological characteristics and catalase activity of 16 isolates obtained from the intestinal content of rainbow trout.

Isolate	Gram	morphology	catalase
S1	positive	cocoid	positive
S2	positive	rod-shaped	negative
S3	positive	cocoid	positive
S4	positive	rod-shaped	negative
S5	positive	cocoid	positive
S6	positive	cocoid	positive
S7	negative	rod-shaped	N/A
S8	positive	rod-shaped	negative
S9	negative	rod-shaped	N/A
S10	positive	cocoid	positive
S11	positive	cocoid	positive
S12	positive	rod-shaped	negative
S13	positive	rod-shaped	negative
S14	positive	rod-shaped	negative
S15	positive	rod-shaped	positive
S16	positive	rod-shaped	negative

Isolates were cultured in MRS agar 24-48 h at 37° C under microaerobic conditions.

N/A: Not Applicable

**Table 3.** Fermentation pattern of hexoses (glucose, fructose or galactose) or pentoses (ribose, xylose or arabinose) of isolates S2, S4, S8, S12, S13 and S14 obtained from the intestinal content of rainbow trout when cultured in MRS broth plus phenol red.

Isolate	Carbohydrate					
	glucose	fructose	galactose	ribose	xylose	arabinose
S2	+	+	-	-	-	-
S4	+g	+g	-	-	-	-
S8	+g	+g	-	+	+	+
S12	+g	+g	-	+	+	+
S13	+	+	-	-	-	-
S14	+	+g	-	+	+	+

Detection of carbohydrate fermentation: + (positive): fermentation of the carbohydrate, - (negative): no fermentation of the carbohydrate, g: presence of gas in Durham tube.

### 3.2. Evaluation of the attributes of a probiotic in the LAB strains

#### 3.2.1. Antibacterial activity of the LAB strains

Except for the LAB strain S12 (LABS12), the rest of them (LABS2, LABS4, LABS8, LABS13 and LABS14) showed antibacterial activity against the indicator bacterial strains (*S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 10145). The inhibition halos produced by the rainbow trout intestinal strains assayed on the indicator strains (Table 4) ranged from 8 mm (LABS8 against *E. coli*) to 31 mm (LABS4 against *P. aeruginosa*). Gram-positive indicator bacteria were more susceptible than Gram negative to the antimicrobial action of the strains, being mostly and significantly inhibited ( $p < 0.05$ ) by LABS4 and LABS14 strains than by strains LABS2, LABS8 and LABS13. Gram-negative reference bacterial strain *E. coli* ATCC 25922 was mainly inhibited by LABS2 ( $p < 0.05$ ) followed by LABS4, both having a significantly higher activity than LABS8, LABS13 and LABS14. *P. aeruginosa* ATCC 10145 strain was mainly inhibited by LABS4, followed by LABS14 both having a significantly higher activity than LABS2, LABS8, and LABS13 strains ( $p < 0.05$ ). Considering that LABS12 showed the poorest antibacterial activity against the indicator bacteria, it was not included in the following assays. LABS12 was unable to produce

an inhibition halo against *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 10145.

**Table 4.** Antibacterial activity of LAB strains (LABS2, LABS4, LABS8, LABS12, LABS13 and LABS14) isolated from the intestinal content of rainbow trout against indicator strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 10145.

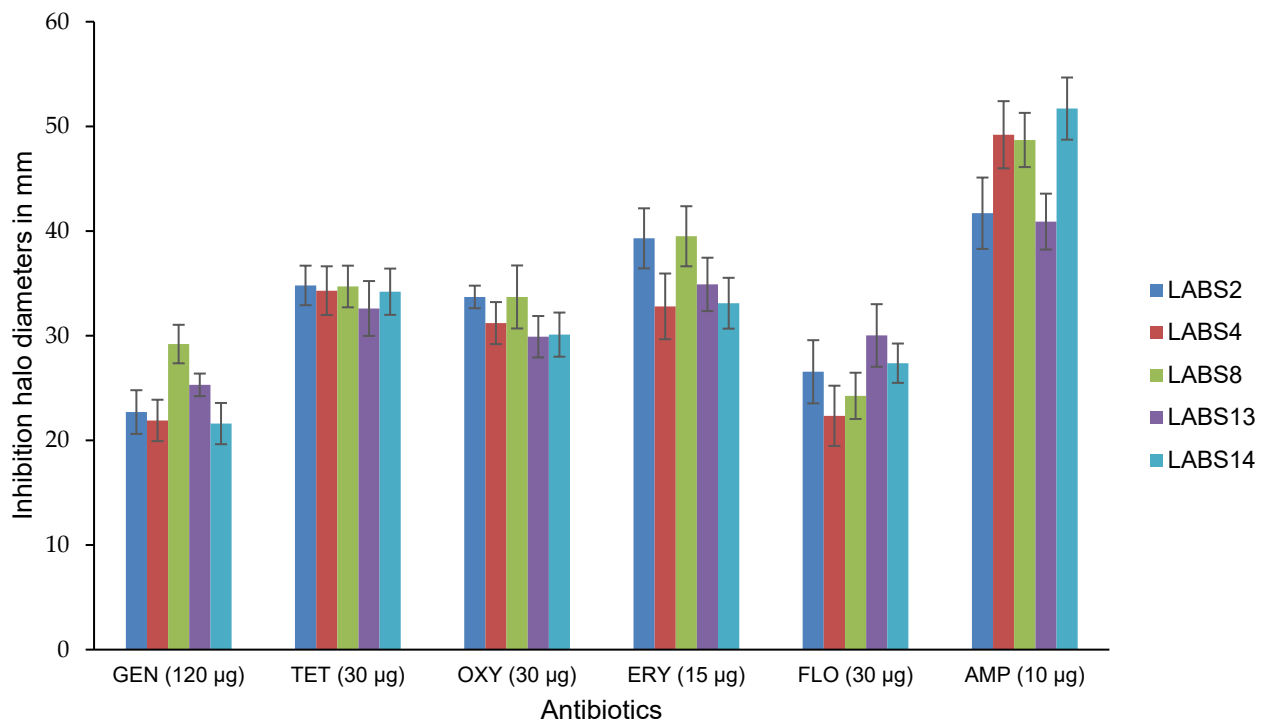
LAB Strains	Inhibition halo (in mm) of reference bacterial strains			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	ATCC 25923	ATCC 6633	ATCC 25922	ATCC 10145
LABS2	16 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>
LABS4	30 <sup>b</sup>	25 <sup>b</sup>	16 <sup>b</sup>	31 <sup>b</sup>
LABS8	20 <sup>c</sup>	18 <sup>a</sup>	8 <sup>c</sup>	12 <sup>a</sup>
LABS12	-	12 <sup>c</sup>	-	-
LABS13	20 <sup>c</sup>	16 <sup>d</sup>	11 <sup>d</sup>	12 <sup>a</sup>
LABS14	26 <sup>d</sup>	20 <sup>e</sup>	12 <sup>de</sup>	18 <sup>c</sup>

-: inhibition halo not observed

<sup>a-e</sup>Means with different superscripts within a column are significantly different ( $p < 0.05$ ). Values are means of two independent experiments, each in triplicate.

### 3.1.2. Antibiotic susceptibility of the LAB strains

The susceptibility of the 5 LAB strains remaining as part of this study (LABS2, LABS4, LABS8, LABS13 and LABS14) to the antimicrobials GEN, TET, OXY, ERY, FLO, and AMP were tested by the disc diffusion method. The susceptibility of the 5 LAB strains is summarized in Figure 1. According to the criteria indicated in Table 1 (Materials and Method, Section 2.4.2. Antibiotic susceptibility test of the LAB strains), all the isolates were found to be susceptible to all the antibiotics tested.



**Figure 1.** Antibiotic susceptibility of the 5 LAB strains (LABS2, LABS4, LABS8, LABS13 and LABS14), obtained from the intestinal content of rainbow trout to the antimicrobials gentamycin (GEN), tetracycline (TET), oxytetracycline (OXY), erythromycin (ERY), florfenicol (FLO), and ampicillin (AMP), evaluated by the disc diffusion antibiotic method according to CLSI (2022) [59]. Data is given as mean  $\pm$  SD. Experiments were carried out in triplicated.

### 3.1.3. Hemolytic activity

The hemolytic activity of the 5 LAB strains (LABS2, LABS4, LABS8, LABS13 and LABS14) was evaluated in MRS agar plus 5% human blood after 24 h, 48 h and 72 h of incubation (Table 5). Because gamma hemolysis is consistent with a LAB strain with probiotic properties, LABS4 and LABS14 were selected for the following assays.

**Table 5.** Type of hemolytic activity on MRS agar plus 5% human blood after 24 h, 48 h and 72 h incubation at 37°C of the selected LAB strains obtained from the intestinal content of rainbow trout.

LAB Strain	Type of hemolysis		
	24 h	48 h	72 h
LABS2	Alpha	Alpha	Alpha
LABS4	Gamma	Gamma	Gamma
LABS8	Alpha	Alpha	Alpha
LABS13	Beta	Beta	Beta
LABS14	Gamma	Gamma	Gamma

The experiments were carried out in triplicate

#### 3.1.4. Hydrophobicity assays

The MATH test, a method used to evaluate the capacity of cells to adhere to another cell surface was assessed for LABS4 and LABS14 measuring absorbance at 600 nm. LABS4 (30%) and LABS14 (37%) showed a medium hydrophobicity. Therefore, LABS4 and LABS14 were selected to evaluate their viability at a low pH.

#### 3.1.5. Cell viability of the LAB strains at low pH

The tolerance at low pH, measured as viability of LABS4 and LABS14 at pH 3 is summarized in Table 6. LABS4 and LABS14 were tolerant to pH 3 showing a viability of 57.1% and 74.8%, respectively, when compared with their respective controls. LABS14 was significantly more resistant to pH3 than LABS4 ( $p < 0.05$ ). Even though the number of CFU recorded from LABS4 or LABS14 strains exposed to pH 3 was significantly reduced when compared to their respective controls ( $p < 0.05$ ), they satisfied the criterium to consider them as tolerant to a low pH.

#### 3.1.6. Cell viability of the LAB strains in the presence of bile salts

The tolerance to bile salts, measured as viability of LABS4 and LABS14 strains in the presence of 0.3% (w/v) bile salts, is summarized in Table 6. LABS4 and LABS14 were tolerant to 0.3% bile salts with 69.2% and 82.3% viability, respectively, when compared with their respective controls. LABS14 was significantly more resistant to 0.3% bile salts than LABS4 ( $p$

< 0.05) Although the number of CFU recorded from LABS4 or LABS14 strains exposed to bile salts was significantly reduced when compared to respective controls ( $p < 0.05$ ), the criterium to consider them as tolerant was fulfilled.

### 3.2. *Screening for biosynthesis of Se<sup>0</sup>Nps by LAB strains (LABstrain-Se<sup>0</sup>Nps)*

The ability of LABS4 or LABS14 to convert Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> into Se<sup>0</sup>Nps was tested. The red color of colonies cultured in medium containing Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> confirms the transformation of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> into Se<sup>0</sup> and the possible capacity of LAB strains to produce Se<sup>0</sup>Nps. Only LABS14 colonies showed red color after incubation at 37°C for 24 h in MRS agar containing 1 mM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. LABS4 failed to produce red color and was, therefore, excluded from the remaining experiments.

### 3.3. *Characterization of LABS14-Se<sup>0</sup>Nps*

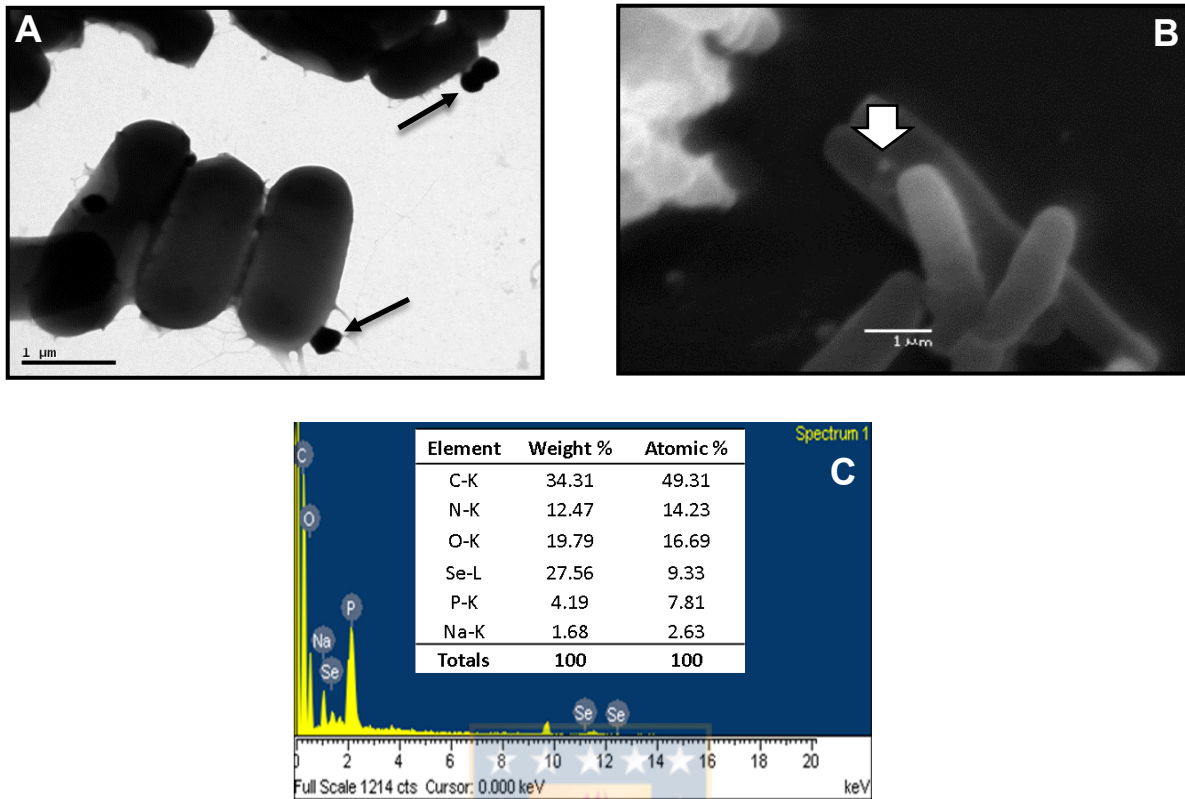
TEM, SEM and SEM-EDS observations (Figure 2) were performed to confirm that LABS14 was able to produce Se<sup>0</sup>Nps when Se was available in the culture medium. Electron microscopy revealed sphere-like nanoparticles, with sizes between 98 and 245 nm in diameter, attached to the surface of LABS14 cells (Figure 2A and 2B). The presence of Se in the nanoparticles was confirmed by SEM-EDS (Figure 2C) allowing them to be considered as Se<sup>0</sup>Nps. The presence of C, N, and O signals can be attributed to cell debris and the presence of Na and P could be associated to remnants of the culture medium (Figure 2C).

**Table 6.** Tolerance to acidic pH and 0.3% bile salts, evaluated by viability, of LABS4 and LABS14 strains isolated from the intestinal content of rainbow trout incubated for 4 h at 37 °C at pH 3 or in the presence of 0.3% (w/v) bile salts.

LAB Strain	Acid resistance		Bile salts resistance	
	pH 3 (Viability %)	Control	Bile salt (Viability %)	Control
LABS4	*8 × 10 <sup>8</sup> ± 0.06 (57.1)	14 × 10 <sup>8</sup> ± 0.12	*9 × 10 <sup>8</sup> ± 0.07 (69.2)	13 × 10 <sup>8</sup> ± 0.18
LABS14	*12 × 10 <sup>8</sup> ± 0.10 (74.8)	16 × 10 <sup>8</sup> ± 0.09	*12 × 10 <sup>8</sup> ± 0.14 (82.3)	15 × 10 <sup>8</sup> ± 0.03

Acid resistance: N° of CFU mL<sup>-1</sup>; Bile resistance: N° of CFU mL<sup>-1</sup>. Results are expressed as percentage of viable cells when compared to control (cells not subjected to HCl or bile salts) assigned as 100%. \*Significantly smaller than corresponding control ( $p < 0.05$ ). Data is given as mean ± SD; Experiments were carried out in triplicated.





**Figure 2.** LABS14- $\text{Se}^0\text{Nps}$ . **A:** TEM micrograph of LABS14 showing a bacillar morphology bacterium with nanoparticles attached to the cell surface (black arrow); **B:** SEM micrograph showing nanoparticles attached to the bacterial surface (white arrow); **C:** SEM-EDS data confirmation of the presence of Se in the nanoparticles ( $\text{Se}^0\text{Nps}$ ).

#### 3.4. Molecular identification of LABS14 strain by 16S rDNA sequence analysis

LABS14 was identified by PCR amplification of the 16S rDNA gene and sequencing of the PCR products (approximately 1500 bp). The sequences obtained were subjected to a BLAST analysis. LABS14 strain was identified with a high level of confidence (98%) as *Lactiplantibacillus plantarum* (access number GenBank AY096004).

### 3.5. Effect of the dietary administration of enriched-(LABS14-Se<sup>0</sup>Nps) as a nutritional supplement in Rainbow Trout (In Vivo Model)

#### 3.5.1. ROS in WBC and lysozyme activity in plasma

The respiratory burst activity of rainbow trout peripheral leukocytes was evaluated by the reduction of NBT into the colored compound formazan (Table 7). Higher absorbances at the wavelength at which formazan absorbs correspond to higher ROS concentrations.

On day 15 and 30, cellular ROS increased significantly in trout receiving LABS14-Se<sup>0</sup>Nps (diet D1) or LABS14(diet D2) ( $p < 0.05$ ) when compared to the control group. On day 15 and 30, ROS concentration in the group receiving LABS14-Se<sup>0</sup>Nps were higher, although not significantly, when compared to fish receiving LABS14 ( $p > 0.05$ ) (Table 7).

Regarding plasma lysozyme activity, it increased significantly ( $p < 0.05$ ) in fish receiving LABS14-Se<sup>0</sup>Nps supplemented food (diet D1) on days 15 and 30 when compared to the control group while LABS14 (diet D2) did it only on day 30 (Table 8). LABS14-Se<sup>0</sup>Nps supplementation caused the highest levels of plasma lysozyme on days 15 and 30, but only on day 15 it was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than that caused by LABS14 (Table 8).

**Table 7.** ROS production by rainbow trout blood leukocytes, evaluated by NBT reduction into formazan. Fish were fed 10<sup>8</sup> CFU LABS14-Se<sup>0</sup>Nps g<sup>-1</sup> or 10<sup>8</sup> CFU LABS14 g<sup>-1</sup> supplemented dry food for 30 days.

Day	Dietary Treatment		
	LABS14-Se <sup>0</sup> Nps	LABS14	Control
0	45.16 ± 3.7	45.49 ± 3.9	44.31 ± 2.9
15	54.12 ± 3.9	51.87 ± 3.4	43.27 ± 4.2
30	57.21 ± 3.6	53.15 ± 3.2	42.23 ± 4.1

NBT: nitroblue tetrazolium. LABS14-Se<sup>0</sup>Nps: Selenium nanoparticle-enriched *Lp. plantarum*; LABS14: *Lp. plantarum*; Control: Acclimation diet. Data is shown as mean ± SD; n = 6 in each sampling day per dietary treatment.

**Table 8.** Plasma lysozyme activity (U mL<sup>-1</sup>) in rainbow trout fed with 10<sup>8</sup> CFU LABS14-Se<sup>0</sup>Nps g<sup>-1</sup> or 10<sup>8</sup> CFU LABS14 g<sup>-1</sup> supplemented dry food for 30 days.

Day	Dietary Treatment		
	LABS14-Se <sup>0</sup> Nps	LABS14	Control
0	35.66 ± 4.1	35.26 ± 4.4	34.59 ± 3.5
15	49.23 ± 3.9	38.57 ± 2.8	35.33 ± 3.8
30	51.12 ± 4.8	46.37 ± 2.9	36.13 ± 3.3

One unit (U) of lysozyme activity corresponds to the amount of lysozyme that caused a 0.001 min<sup>-1</sup> decrease in absorbance. LABS14-Se<sup>0</sup>Nps: Selenium nanoparticle-enriched *Lp. plantarum*; LABS14: *Lp. plantarum*; Control: Acclimation diet. Data is shown as mean ± SD; n = 6 in each sampling day per dietary treatment.

### 3.5.2. Activity of the antioxidant enzyme Gpx

The activity of the enzyme Gpx in plasma, liver, and dorsal muscle of rainbow trout fed with LABS14-Se<sup>0</sup>Nps or LABS14 supplemented food for 30 days is shown in Table 9. When compared to the control group, significant increases in Gpx activity were observed on day 30 in plasma, liver, and dorsal muscle in the groups receiving D1 or D2 supplemented diets ( $p < 0.05$ ). When compared to fish fed with the D2 diet, the group receiving the D1 diet showed higher Gpx activities in all samples, but the difference being significant only in plasma and muscle.

**Table 9.** Glutathione peroxidase (Gpx) activity in rainbow trout fed with 10<sup>8</sup> CFU LABS14-Se<sup>0</sup>Nps g<sup>-1</sup> or 10<sup>8</sup> CFU LABS14 g<sup>-1</sup> supplemented dry food for 30 days.

Gpx Activity	Dietary Treatment		
	LABS14-Se <sup>0</sup> Nps	LABS14	Control
Plasma	281.47 ± 3.8	269.73 ± 4.7	251.28 ± 3.9
Liver	37.17 ± 4.2	34.21 ± 2.3	23.74 ± 1.8
Muscle	39.66 ± 3.6	35.19 ± 3.1	24.66 ± 3.2

Gpx: Glutathione peroxidase expressed in mU mg<sup>-1</sup> protein. LABS14-Se<sup>0</sup>Nps: Selenium nanoparticle-enriched *Lp. plantarum*; LABS14: *Lp. plantarum*; Control: Acclimation diet. Data is shown as mean ± SD; n = 6 in each sampling day per dietary treatment.

### 3.5.3. Growth performance and survival

Growth performance and survival rate of fish receiving both dietary treatments during the 30 days period is shown in Table 10. Weight gain (WG) was significantly higher in the D1 (93.2 g) and D2 (87.1 g) fed groups when compared to the AD group (73.8 g) ( $p < 0.05$ ). Similarly, the specific growth rate (SGR) values were significantly higher in D1 (2.03%) and D2 (1.91%) dietary treatment groups when compared to the control group (1.71%) ( $p < 0.05$ ). Although the fish group fed with D1 showed the highest SGR value, this was non-significantly higher than that of the D2 fed group.

The final condition factor (FCF) of trout fed with the diet D1 (1.69%) was significantly higher than the FCF of the control group (1.23%) ( $p < 0.05$ ) but non significantly higher than /the group fed with the D2 diet (1.63%) ( $p > 0.05$ ).

**Table 10.** Growth performance and survival rate of rainbow trout fed with  $10^8$  CFU LABS14-Se<sup>0</sup>Nps or  $10^8$  CFU LABS14 g<sup>-1</sup> supplemented dry diet food for 30 days.

Index	Dietary Treatment		
	LABS14-Se <sup>0</sup> Nps	LABS14	Control
IW (g fish <sup>-1</sup> )	110.8 ± 4.1	112.3 ± 4.7	109.5 ± 3.8
FW (g fish <sup>-1</sup> )	204.2 ± 3.9	199.4 ± 4.1	183.2 ± 3.1
WG (g)	93.2 ± 4.1	87.1 ± 4.8	73.8 ± 3.8
SGR (%)	2.03 ± 0.2	1.91 ± 0.3	1.71 ± 0.2
ICF (%)	1.24 ± 0.3	1.26 ± 0.2	1.22 ± 0.2
FCF (%)	1.69 ± 0.4	1.63 ± 0.4	1.23 ± 0.3
Survival rate (%)	100	100	100

LABS14-Se<sup>0</sup>Nps: Selenium nanoparticle-enriched *Lp. plantarum*; LABS14: *Lp. plantarum*; Control: Acclimation diet (AD). IW: initial weight; FW: final weight; WG: weight gain; SGR: specific growth rate; ICF: initial condition factor; FCF: final condition factor. Survival rate at the end of the assay (day 30). Data is given as mean ± SD; n = 6 in sampling day per dietary treatment.

#### 4. Discussion

A list of characteristics for potential probiotic bacteria for aquacultured species, as reported by Merrifield *et al.* [18], includes to be naturally occurring and non-pathogenic in the native habitat of the host, they should be easy to culture and able to grow in the intestine of the host (thus, requiring resistance to bile salts and to low pH, adherence within the intestinal mucus, and being able to colonize the intestinal epithelial surface). Probiotic candidates should not possess plasmid-encoded antibiotic resistance genes and should have positive effects on fish health and/or nutrition. Dietary supplementation with probiotics contributes to the balance of the intestinal microbiota and probiotics have been proposed as an alternative to chemotherapeutants and antibiotics to prevent disease outbreaks, to mitigate the negative effects of stress and to strengthen the antioxidant capacity and the immune system of fish [85]. As intensive fish farming is facing the problem of massive losses caused by diseases, probiotics are being used to control diseases [86].

LAB, such as *Lp. plantarum*, are used as probiotics in fish production because of their beneficial effects; for example, in feed utilization [87, 88], as growth promoters [89], as immune response enhancers [90] and as stress tolerance improvers [87]. It has also been reported that some LAB are able to absorb Se ions and produce Se<sup>0</sup>Nps to finally become selenium-enriched bacterial cells with high biological activity [91-93]. On this basis, we hypothesized that supplementing fish food with a LAB strain having properties of a probiotic and, concurrently, able to biosynthesize Se<sup>0</sup>Nps may have a better potential to improve the innate immune response, the oxidative status, and productive parameters of rainbow trout than supplementing their food with only probiotics.

We obtained 16 possible LAB autochthonous isolates from the intestinal content of rainbow trout and tested them to select the most suitable probiotic LAB candidates. Only six of them (LABS2, LABS4, LABS8, LABS12, LABS13 and LABS14) showed characteristics attributable to LAB strains (rod-shaped, non-motile, Gram-positive, catalase negative and lactic acid producing bacteria) [94]. Therefore, these six LAB strains were considered to be tested, according to Rondón *et al.* [55], to determine if they possessed the characteristics of potential probiotics. The characteristics evaluated were their antibacterial activity, antibiotic susceptibility, viability at a low pH, tolerance to bile salts, hemolytic activity and hydrophobicity.

Strains not fulfilling the requirement of a particular characteristic were excluded and not considered to evaluate the remaining characteristics in them.

Results of the antibacterial activity showed that, except LABS12, all other strains (LABS2, LABS4, LABS8, LABS13 and LABS14) had antibacterial activity against Gram-positive (*S. aureus* and *B. subtilis*) and Gram-negative (*E. coli* and *P. aeruginosa*) indicator bacteria. The Gram-positive indicator strains were more susceptible than Gram-negative indicator strains to the antibacterial activity of the isolated LAB. Our findings are similar to those reported by Savadogo *et al.* [95] and Tebyanian *et al.* [96] indicating that Gram-positive bacteria are more susceptible than Gram-negative bacteria to the antibacterial mechanisms executed by LAB strains. The antibacterial activity of probiotics has been attributed mostly to the production of antimicrobial substances or metabolites and to the mechanism of competitive exclusion, in which probiotic strains compete with pathogens for nutrients and attachment sites, preventing colonization of the intestine by pathogens [97]. Among the antimicrobial substances produced by probiotic strains, organic acids (especially lactic and acetic acids), hydrogen peroxide and bacteriocins are the ones most reported [98].

The European Food Safety Authority (EFSA) guidelines indicate that all bacterial strains intended for human or animal consumption must be tested for antibiotic susceptibility. The rationality is to avoid these bacteria to become a source of antibiotic resistance genes which could be transferred to other bacteria of the host microbiota or environment bacterial communities [99]. According to Bujnakova & Strakova [100], strains harboring acquired resistance patterns must be excluded from hosts and environment. Our results concerning the susceptibility of LABS2, LABS4, LABS8, LABS13 and LABS14 to GEN, TET, OXY, ERY, FLO and AMP, according to the CLSI [59], revealed that all five LAB strains, being susceptible to the antibiotics tested, were considered for the following tests, including hemolytic activity, hydrophobicity (which estimates the capacity of a cell to adhere to another cell surface), cell viability at low pH and tolerance to bile salts. These tests evaluated, according to Rondón *et al.* [55], properties of the LAB isolates consistent with a probiotic.

The hemolytic activity assays showed that only LABS4 and LABS14 strains caused gamma hemolysis. In general, pathogenic bacteria are able to lyse erythrocytes and other cell membranes synthesizing and secreting hemolysins, considered as virulence factors [101]. Therefore, both alpha- and beta-hemolytic phenotypes are considered virulence-associated

determinants of bacterial species and/or strains [102]. On the other hand, gamma-hemolysis indicates the lack of hemolytic activity of bacteria [103]. Thus, when considering the safety of a probiotic, the absence of hemolysins is an important consideration [14]. Hence, only LABS4 and LABS14 strains could be reasonably selected for the following test: hydrophobicity assay. Cell hydrophobicity, important property for probiotic bacteria, allows them to adhere to the intestinal epithelium and colonize the gastrointestinal tract to provide their beneficial effect, such as exclusion of enteropathogenic bacteria [104]. LABS14 strain showed a higher level of hydrophobicity than LABS4; nevertheless, the hydrophobicity of both strains was considered as medium. Hydrophobicity figures from 30% to 60% are considered as medium while over 60% is considered as high [62], indicating that besides hydrophobicity other variables may influence the adherence of cells. Therefore, it is reasonable to consider that LABS4 and LABS14 strains could efficiently avoid the adherence of enteropathogenic bacteria to the gastrointestinal epithelium of rainbow trout. Thus, LABS4 and LABS14 strains were both included in the following test: cell viability of the LAB strains isolated at a low pH assay. According to Bravo *et al.* [107], in salmonid fish fed with artificial diets the gastric pH dropped to 3.5. At a pH <5, the growth of several Gram-negative bacteria is reduced, so a low pH also creates a natural barrier against pathogens from the environment and favors the proliferation of acid-tolerant, beneficial bacteria, such as LAB [108]. LABS14 and LABS4 strains were able to tolerate a pH of 3 (74.8% and 57.1% viability, respectively). Based on the report of Fečkaninová *et al.* [94], LABS14 and LABS4 viabilities after being grown at a low pH suggest that these strains can reach the intestine in a viable form. Therefore, LABS14 and LABS4 were both included in the following test: tolerance of the LAB strains isolated to bile salts assay.

Bacterial resistance to intestinal bile salts is another parameter to consider when selecting probiotic bacteria [109]. Then, we can suggest that LABS14 and LABS4 may colonize the rainbow trout intestine because both resisted 0.3% bile salts, a concentration similar to that resisted by a strain of *Lp. plantarum* with probiotic potentiality obtained from the Mediterranean trout (*Salmo macrostigma*) intestine [110]. The secretion of bile salts into the gastrointestinal tract can limit bacterial growth, acting as antimicrobial molecules, even at low concentrations [111]. Nevertheless, probiotics may tolerate them producing bile salts hydrolase enzymes [112]. Thus, the capacity of LABS14 and LABS4 to produce Se<sup>0</sup>Nps when cultured in Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> supplemented culture medium was evaluated.

The metabolism of LAB leading to transform inorganic Se into elemental Se ( $\text{Se}^0$ ) involves a high activity of the enzyme glutathione reductase (GR) [116] and these authors concluded that a number of LAB strains overexpressed genes coding for GR (*GshR/gor*) when grown in the presence of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Selenite may react with glutathione producing selenotrisulfide derivatives, which are intermediates in the conversion of inorganic Se into bioactive selenocompounds. In this reaction, reduced glutathione (GSH) is oxidized to Se diglutathione (GSSeSG) which is, in turn, reduced back to GSH by GR. Unstable GSSeSG is decomposed to form  $\text{Se}^0$  [117] allowing LAB cells to form  $\text{Se}^0$ -cysteine (SeCys) and  $\text{Se}^0$ -methionine [41].

When cultured in the presence of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , LABS14 colonies, but not LABS4 colonies, acquired a red color. Daza *et al.* [67] and Ravanal [113] also reported the same phenomenon for the  $\text{Se}^0$ Nps biosynthesized by the bacterium *Pantoea agglomerans*, attributable to intracellular red amorphous Se, a non-crystalline allotropic form of Se, resulting from the enzymatic reduction of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Production of  $\text{Se}^0$ Nps by bacteria would be a detoxification process in which Se (IV) is reduced to non-soluble Se ( $\text{Se}^0$ ) and later stored as electron-dense amorphous granules which are deposited in the cytoplasm and/or the extracellular space [114, 115]. Since LABS4 was unable to reduce  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , only LABS14 strain cells were analyzed by TEM, SEM and SEM-EDS. Observations revealed that LABS14 was able to produce sphere-like  $\text{Se}^0$ Nps, which were located in the surface of cells.

The transformation of inorganic Se into  $\text{Se}^0$ Nps by LAB has been previously reported [40, 41, 121, 122]. Reported size of biosynthesized  $\text{Se}^0$ Nps by some *Lp. plantarum* strains are: < 250 nm (Yazdi *et al.*, 2012), between 55 and 90 nm [116] and 142.6 nm average [42]. According to Zhang *et al.* [123], smaller  $\text{Se}^0$ Nps have greater biological activity. The report of Hosnedlova *et al.* [123] showed that the gastrointestinal tract absorption of  $\text{Se}^0$ Nps biosynthesized by *L. lactis* was 15 to 250 times higher when particles were 50 to 90 nm than nanoparticles of 125-155 nm.

Since LABS14 showed that its tested characteristics are consistent with those of probiotics and that it was concurrently able to produce  $\text{Se}^0$ Nps, it was molecularly identified by 16S rDNA sequence analysis. The analysis revealed, with a 98% of confidence, that this isolate (GenBank accession number AY096004.1) corresponds to *Lp. plantarum*, a LAB



species of considerable industrial and medical interest [118] and already evaluated as a probiotic for rainbow trout [27, 119, 120].

In the present study, *Lp. plantarum* strain S14 containing Se<sup>0</sup>Nps (LABS14-Se<sup>0</sup>Nps) or lacking Se<sup>0</sup>Nps (LABS14), corresponding to diet D1 or D2, respectively, were administered to rainbow trout as a food supplement for 30 days. The effects of supplementations on two parameters of the innate immune response (ROS production by WBC and plasma lysozyme), oxidative status (activity of Gpx in plasma, liver and muscle), and productive parameters, were studied.

Phagocytosis is a fundamental process for the ingestion and elimination of microbial pathogens and apoptotic cells by phagocytes [125]. Phagocytes produce respiratory bursts to eliminate pathogens and these bursts can be measured to evaluate the defensive response of the host. Superoxide anions along with hydroxyl radicals and nitric oxides are induced reactive oxygen species (ROS), which enhance the microbicidal capacity of phagocytes [126, 127]. Our results showed a significantly higher ROS concentration in WBCs of rainbow trout fed with D1 or D2 diets since day 15. At the end of the assay (day 30) ROS concentrations were even higher than those of day 15, showing a progressive improvement of the microbicidal capacity of WBCs. Soltani *et al.* [128] demonstrated that the dietary administration of *Lp plantarum* also improved neutrophil ROS concentration in the common carp (*Cyprinus carpio*).

Although a non-significant difference, WBCs of fish fed with D1 diet showed a higher ROS concentration than those of fish fed with the D2 diet on days 15 and 30. Hence, a combined effect of probiotic and Se<sup>0</sup>Nps on the respiratory burst of rainbow trout phagocytic cells can be suggested. Chen *et al.* [129], showed a potential higher phagocytic capacity of macrophages of mice fed with *Lactobacillus sp* containing higher concentrations of intracytoplasmic Se<sup>0</sup>, their phagocytic index depending on the intracellular Se concentration in Se-enriched bacteria. They pointed out that Se might provide additional protection to the cell membrane of macrophages against oxidative damage.

Lysozyme, produced by neutrophils and macrophages and secreted into blood and mucus to exert bacteriolytic effects, is one of the most important nonspecific immune factors of fish [130]. Its level and activity in fish depends, among others, on the nutritional status [131].

This study demonstrated that rainbow trout receiving D1 or D2 diets significantly increased their plasma lysozyme activity levels when compared to the control group on day 15. Noteworthy, D1 diet caused a better lysozyme activity than D2 treatment on both testing days, suggesting a combined effect of the probiotic strain LABS14 and Se<sup>0</sup>Nps on lysozyme plasmatic level by rainbow trout.

The effect of food supplemented with *Lp. plantarum* on the increasing of lysozyme activity in the blood has been previously demonstrated in the rainbow trout [133], striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) [134] and the Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [135]. On the other hand, several reports demonstrated that the effect of the dietary supplementation with Se<sup>0</sup>Nps significantly improved tissular lysozyme activity in various fish species, including, among others, rainbow trout [82, 136], yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) [137] and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [138]. To the best of our knowledge, there are no other reports pertaining the combined effect of *Lp. plantarum* and Se<sup>0</sup>Nps on lysozyme activity in vertebrates. However, Shang *et al.* [132] reported a significantly higher activity, when compared to the control group, of blood lysozyme in carps (*Cyprinus carpio var. specularis*) exposed to Hg for 30 days when their food was supplemented for 30 days with Se-enriched, not in the form of nanoparticles, probiotic *Bacillus subtilis*.

The supply of antioxidants is important for fish in wildlife, but also in captivity, as they are subjected to various stressors such as changes in oxygen levels that are associated with an increase of ROS [139]. Magnoni *et al.* [140] indicated both nutritional and environmental stressors are able to cause OS, reduce innate immune and OS response, and diminish energy generation by affecting metabolic pathways in rainbow trout. In our study, diet D1 determined higher Gpx activity in plasma, liver and muscle of the rainbow trout when compared to D2 or AD diets suggesting a combined effect of LABS14 strain and the Se<sup>0</sup>Nps produced by the bacterium on tissular Gpx activity. Chen *et al.* [129] reported that supplementation of mice food with Se-enriched *Lactobacillus* ameliorated or enhanced Gpx activity biosynthesis in a *Lactobacillus* cytoplasm Se concentration-dependent manner. Also, Mengistu *et al.* [141] reported a combined effect of Se and *Lactobacillus acidophilus*. Supplementation of chickens' food with Se-enriched *Lactobacillus acidophilus* for 42 days determined a significant upregulation of the Gpx1, Gpx4, seleno-protein W, and interferon gamma mRNA expression when compared to mRNA expression in groups of chickens feed with *L. acidophilus* or sodium

selenite supplemented food and control group (non-supplemented food). Shang *et al.* [142] also demonstrated an increasing of Gxp activity in juvenile *Luciobarbus capito* using Se-enriched *Lp. plantarum* as a food supplement. Shang and colleagues did not precisely clarified what form of Se was present in the cytoplasm of *Lp. plantarum*.

This study also investigated the effect of D1 or D2 diets as a 30-day food supplement on growth performance. Both diets significantly improved all growth performance indexes evaluated when compared to the control. When the nutrient supplementations were compared, rainbow trout fed with diet D1 showed a higher, but non-significant, growth performance than that observed in fish fed with the diet D2. A FCF above 1.00 corresponds to a good health condition or well-being of fish and it correlates with an increase of important production parameters, such as fertility rate, which involves the production of high-quality gametes [143]. Our results suggest a combined effect of LABS14 strain and Se<sup>0</sup>Nps on physiological processes that impact on the rainbow trout growth performance. Diet D1 may favor a better efficiency of rainbow trout accumulating energy reserves.

Probiotic bacteria protect the epithelial cells from the toxins of pathogenic microorganisms exerting direct antimicrobial action toward competing enteropathogens which may prevent colonization by pathogens [144] resulting in enhanced intestinal absorption capacity and immunity [145]. As a result, absorbed nutrients (e.g., vitamins, amino acids, and fatty acids) can easily reach the bloodstream to contribute to the metabolic functions in the entire body. In other words, host derived probiotics can indirectly enhance the digestibility of nutrients in fish intestines by competence with pathogenic microorganisms and inhibit their harmful impact on intestinal health[146]. Use of diets supplemented with *Lp. plantarum* have shown to improve feed efficiency and growth in different fish species [134, 147-150]. Soltani *et al.* [128] indicated the improvement of immunological parameters achieved when supplying *Lp. plantarum* in the diet, resulting in better growth conditions for rainbow trout. On the other hand, the beneficial effect of Se<sup>0</sup>Nps on the growth performance of fish as European seabass (*Dicentrarchus labrax*) [151], Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [138] and crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) [152], among others, has been reported. A previous study using biogenic Se<sup>0</sup>Nps as a dietary supplement in rainbow trout showed an increasing of the final condition factor index only after 30 days of experimentation [136]. A *Bacillus subtilis* selenium-

enriched probiotic, administered in the diet as a growth promoter, has been evaluated in broiler chicken with promising results [153].

## 5. Conclusions

Our results reported the isolation of a LAB strain, named S14 strain, from the intestinal content of healthy rainbow trout. S14 strain was identified, with a high level of confidence (98%), as belonging to the *Lactiplantibacillus plantarum* species. This strain showed characteristics typically present in probiotics and, concurrently, the capacity to biosynthesize Se<sup>0</sup>Nps. The supplementation of the rainbow trout diet with LABS14-Se<sup>0</sup>Nps showed a positive effect on innate immune response parameters, oxidative status, well-being, and a better growth performance than the supplementation of the diet with the bacterium LABS14 alone. Therefore, we propose LABS14-Se<sup>0</sup>Nps as a promising alternative for nutritional supplementation for rainbow trout or even other salmonids.



## 6. References

1. Iversen, A.; Asche, F.; Hermansen, Ø.; Nilstøyl, R. Production cost and competitiveness in major salmon farming countries 2003–2018. *Aquaculture* **2020**, *522*, 735089.
2. Valenzuela, C.A.; Ponce, C.; Zuloaga, R.; González, P.; Avendaño-Herrera, R.; Valdés, J.A.; Molina, A.. Effects of crowding on the three main proteolytic mechanisms of skeletal muscle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *BMC Veterinary Research* **2020**, *16*, 294.
3. Harper, C.; Wolf, J.C. Morphologic Effects of the Stress Response in Fish. *ILAR J.* **2009**, *50*(4),387–396.
4. Subpesca. Informe ambiental de la acuicultura. Periodo 2015 a 2016. Subsecretaria de Pesca y Acuicultura, Ministerio de Economía, Gobierno de Chile, **2017**, 91 pp.
5. Urbina, M.A. Temporal variation on environmental variables and pollution indicators in marine sediments under sea Salmon farming cages in protected and exposed zones in the Chilean inland Southern Sea. *Science of the Total Environment* **2016**, *573*, 841–853.
6. Cabello F.C.; Godfrey, H.P. Salmon aquaculture, *Piscirickettsia salmonis* virulence, and One Health: Dealing with harmful synergies between heavy antimicrobial use and piscine and human health. *Aquaculture* **2019**, *507*, 451-456.
7. Talwar, C.; Nagar S.; Lal, R.; Negi, R.K. Fish gut microbiome: current approaches and future perspectives. *Indian J. Microbiol* **2018**, *58*, 397-414.
8. Navarrete, P.; Mardones, P.; Opazo, R.; Espejo, R.; Romero, J. Oxytetracycline Treatment Reduces Bacterial Diversity of Intestinal Microbiota of Atlantic Salmon. *Journal of Aquatic Animal Health* **2008**, *20*(3), 177-183.
9. Donati, V.L.; Madsen, L.; Middelboe, M.; Strube, M.L.; Dalsgaard, I. The Gut Microbiota of Healthy and *Flavobacterium psychrophilum*-Infected Rainbow Trout Fry Is Shaped by Antibiotics and Phage Therapies. *Front Microbiol.* **2022**, *13*, 771296.
10. Valdés, N.; González, A.; García, V.; Tello, M. Analysis of the Microbiome of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to the Pathogen *Flavobacterium psychrophilum* 10094. *Microbiol Resour Announc.* **2020**, *9*, e01562-19.

11. Wang, N.; Jiang, M.; Zhang, P.; Shu, H.; Li, Y.; Guo, Z.; Li, Y. Amelioration of Cd-induced bioaccumulation, oxidative stress and intestinal microbiota by *Bacillus cereus* in *Carassius auratus gibelio*. *Chemosphere* **2020**, 245, 125613.
12. Wang, N.; Yuan, Z.; Wang, K.; Gao, D.; Liu, Z.; Liles, M.R. Consumption of florfenicol-medicated feed alters the composition of the channel catfish intestinal microbiota including enriching the relative abundance of opportunistic pathogens. *Aquaculture* **2019**, 501, 111-118.
13. Sernapesca. Informe Sobre Uso de Antimicrobianos en la Salmonicultura Nacional 2019. Valparaíso: servicio Nacional de Pesca y Acuicultura 2020. Available at: <http://www.sernapesca.cl>.
14. FAO/WHO. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and nutrition paper 85. Rome. **2006**. ISSN 0254-4725.
15. Sharifuzzaman SM, Austin B. *Probiotics for disease control in aquaculture*. In: Austin B. & Newaj-Fyzul, A (Eds). *Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish*. **2017**, Chapter 8, Pp 189-222.
16. Das, S.; Mondal, K.; Haque, S. A review on application of probiotic, prebiotic and synbiotic for sustainable development of aquaculture. *Journal of Entomology and Zoology Studies* **2017**, 5(2), 422-429.
17. Romero J, Feijoó CG, Navarrete P. *Antibiotics in aquaculture—use, abuse, and alternatives*. In: *Health and Environment in Aquaculture*. In Tech; **2012**. Available from: <https://www.intechopen.com/download/pdf/35141>.
18. Merrifield, D.; Bradley, G.; Harper, G.; Baker, R.; Munn, C.; Davies, S. Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquac Nutr*. **2011**, 17(1), 73–79.
19. Lamari, F.; Castex, M.; Larcher, T.; Ledevin, M.; Mazurais, D.; Bakhrouf, A.; Gatesoupe, F-J. Comparison of the effects of the dietary addition of two lactic acid bacteria on the development and conformation of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax*, and the influence on associated microbiota. *Aquaculture* **2013**, 376, 137–145.
20. Shahid, M.; Hussain, B.; Riaz, D.; Khurshid, M.; Ismail, M.; Tariq, M. Identification and partial characterization of potential probiotic lactic acid bacteria in freshwater *Labeo rohita* and *Cirrhinus mrigala*. *Aquac Res*. **2016**, 48(4), 1688–1698.

21. Quinto, E.J.; Jiménez, P.; Caro, I.; Tejero, J.; Mateo, J.; Girbés, T. Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences* **2014**, *5*, 1765-1775.
22. Olofsson, T.C.; , Butler, È.; Markowicz, P.; Lindholm, C.; Larsson, L.; Vásquez, A. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees - an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *Int Wound J.* **2016**, *13*(5), 668-79.
23. Llewellyn, M.S.; McGinnity, P.; Dionne, M.; Letourneau, J.; Thonier, F.; Carvalho, G.R.; Creer, S.; Derome, N. The biogeography of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) gut microbiome. *The ISME journal* **2016**, *10*(5), 1280-1284.
24. Fidanza, M.; Panigrahi, P.; Kollmann, T.R. *Lactiplantibacillus plantarum*–Nomad and Ideal Probiotic. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 712236.
25. Gildberg, A.; Johansen, A.; Bøgwald, J. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture* **1995**, *138*(1), 23–34.
26. Pérez-Sánchez, T.; Balcázar, J.; García, Y.; Halaihel, N.; Vendrell, D.; De Blas, I.; Merrifield, D.; Ruiz-Zarzuela, I. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *J Fish Dis.* **2011**, *34*(7), 499–507.
27. Soltani, M.; Pakzad, K.; Taheri-Mirghaed, A.; Mirzargar, S.; Hosseini, S.P.; Yosefi, P.; Soleymani, N. Dietary Application of the Probiotic *Lactobacillus plantarum* 426951 Enhances Immune Status and Growth of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Vaccinated Against *Yersinia ruckeri*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **2019**, *11*, 207–219.
28. Takahashi, K.; Suzuki, N.; Ogra, Y. Effect of gut microflora on nutritional availability of selenium. *Food Chem.* **2020**, *319*, 126537.
29. Naderi, M.; Keyvanshokoo, S.; Salati, A.P.; Ghaedi, A. Combined or individual effects of dietary vitamin E and selenium nanoparticles on humoral immune status and serum parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under high stocking density. *Aquaculture* **2017**, *474*, 40–47.
30. Baeverfjord, G.; Prabhu, P.A.; Fjellidal, P.G.; Albrektsen, S.; Hatlen, B.; Denstadli, V.; Ytteborg, E.; Takle, H.; Lock, E.-J.; Berntssen, M.H.G.; Lundebye, A.-K.; Asgard, T.; Waagbø, R. Mineral nutrition and bone health in salmonids. *Rev. Aquac.* **2018**, *11*, 740–765.

31. Rathore, S.S.; Murthy, H.S.; Mamun, M.A.-A.; Nasren, S.; Rakesh, K.; Kumar, B.T.N.; Abhiman, P.B.; Khandagale, A.S. Nanoselenium supplementation to ameliorate nutrition physiology, immune response, antioxidant system and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biol. Trace Elem. Res.* **2021**, *199*, 3073–3088.
32. Ibrahim, M.S.; El-gendy, G.M.; Ahmed, A.I.; Elharoun, E.R.; Hassaan, M.S. Nanoselenium versus bulk selenium as a dietary supplement: Effects on growth, feed efficiency, intestinal histology, haemato-biochemical and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) fingerlings. *Aquac. Res.* **2021**, *00*:1–14.
33. Karamzadeh, M.; Yahyavi, M.; Salarzadeh, A.; Nokhbe Zare, D. The effects of different concentrations of selenium and zinc nanoparticles on growth performance, survival and chemical composition of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Iran. Sci. Fish. J.* **2021**, *29*, 43–51.
34. Deilamy Pour, H.; Mousavi, S.M.; Zakeri, M.; Keyvanshokoh, S.; Kochanian, P. Synergistic effects of selenium and magnesium nanoparticles on growth, digestive enzymes, some serum biochemical parameters and immunity of Asian sea bass (*Lates calcarifer*). *Biol. Trace Elem. Res.* **2021**, *199*, 3102–3111.
35. Sarkar, B.; Bhattacharjee, S.; Daware, A.; Tribedi, P.; Krishnani, K.K.; Minhas, P.S. Selenium nanoparticles for stress-resilient fish and livestock. *Nanoscale Res. Lett.* **2015**, *10*, 371.
36. Mechlaoui, M.; Dominguez, D.; Robaina, L.; Geraert, P.-A.; Kaushik, S.; Saleh, R.; Briens, M.; Montero, D.; Izquierdo, M. Effects of different dietary selenium sources on growth performance, liver and muscle composition, antioxidant status, stress response and expression of related genes in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **2019**, *507*, 251-259.
37. Arshad, A. Bacterial Synthesis and Applications of Nanoparticles. *Nano Sci. Nano Technol.* **2017**, *11*, 119.
38. Dawood, M.A.O.; Zommara, M.; Eweedah, N.M.; Helal, A.I. The evaluation of growth performance, blood health, oxidative status and immune-related gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed dietary nano selenium spheres produced by lactic acid bacteria. *Aquaculture* **2020**, *515*, 734571.



39. Yang, J.; Yang, H. Recent development in Se-enriched yeast, lactic acid bacteria and bifidobacterial. *Critical reviews in food science and nutrition*. **2021**. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1948818>.
40. Moreno-Martin, G., Pescuma, M., Pérez-Corona, T., Mozzi, F., and Madrid, Y. Determination of size and mass-and number-based concentration of biogenic SeNPs synthesized by lactic acid bacteria by using a multimethod approach. *Anal. Chim. Acta*. **2017**, 992, 34–41.
41. Pescuma, M.; Gomez-Gomez, B.; Perez-Corona, T.; Font, G.; Madrid, Y.; Mozzi, F. Food prospects of selenium enriched-*Lactobacillus acidophilus* CRL 636 and *Lactobacillus reuteri* CRL 1101. *J. Funct. Foods*. **2017**, 35, 466–473.
42. Salama, H.H.; El-Sayed, N.; Abd-Rabou, N.S.; Hassan, Z.M.R. Production and use of eco-friendly selenium nanoparticles in the fortification of yoghurt. *J Food Process Preserv*. **2021**, 00, e15510.
43. Shang, X; Xu, W.; Zhao, Z.; Luo, L.; Zhang, Q.; Li, M.; Sun, Q.; Geng, L. Effects of exposure to cadmium (Cd) and selenium-enriched *Lactobacillus plantarum* in *Luciobarbus capito*: Bioaccumulation, antioxidant responses and intestinal microflora. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **2022**, 257, 109352.
44. Khattab, A.E-N.; Darwish, A.M.; Othman, S.I.; Allam, A.A.; Alqhtani, H.A. Anti-inflammatory and Immunomodulatory Potency of Selenium-Enriched Probiotic Mutants in Mice with Induced Ulcerative Colitis. *Biological Trace Element Research* **2022**, <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03154-1>.
45. Office International des Epizooties (OIE). *Welfare of farmed fish during transport*. In: OIE - Aquatic Animal Health Code. Chapter 7.2. **2015**. Available in: [https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/aahc/2010/chapitre\\_welfare\\_transport\\_farm\\_fish.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahc/2010/chapitre_welfare_transport_farm_fish.pdf)
46. American Veterinary Medical Association (AVMA). Guidelines for the Euthanasia of Animals: **2020** Edition. ISBN 978-1-882691-09-8. Schaumburg, IL 60173. USA. Available in: <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>
47. Huys, G.; D'Haene, K.; Swings, J. Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. *Letters in Applied Microbiology* **2002**, 34(6), 402-406.

48. Saha, U.S.; Misra, R.; Tiwari, D.; Prasad, K.N. A cost-effective anaerobic culture method & its comparison with a standard method. *Indian J Med Res.* **2016**, 144(4), 611–613.
49. Temmerman, R.; Huys, G.; Swings, J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology* **2004**, 15(7-8), 348-359.
50. Khalid, K. An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences* 2011, 1(3), 1-13.
51. Procop, G.W.; Church, D.L.; Hall, G.S.; Janda, W.M.; Koneman, E.W.; Schreckenberger, P.C.; Woods, G.L. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. **2017**, Seventh edition. Wolters Kluwer. ISBN 9781451116595.
52. Salvetti, E.; Torriani, S.; Felis, G.E. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics & Antimicro. Prot.* **2012**, 4, 217–226.
53. Klayraung, S.; Okonogi, S. Antibacterial and Antioxidant activities of acid and bile resistant strains of *Lactobacillus fermentum* isolated from miang. *Brazilian Journal of Microbiology* **2009**, 40(4), 757-766.
54. Erkus, O. Isolation, phenotypic and genotypic characterization of yoghurt starter bacteria. Master of Sciences Thesis, Izmir Institute of Technology, Izmir, Turkey, January 2007.
55. Rondón, A. J.; Samaniego, L. M.; Bocourt, R.; Rodríguez, S.; Milián, G.; Ranilla, M. J.; Laurencio, M.; Pérez, M. Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2008**, 6(1), 56-63.
56. Schillinger, U.; Lücke, F. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* **1989**, 55( 8), 1901-1906.
57. Geria, M.; Dambrosio, A.; Normanno, G.; Lorusso, V.; Caridi, A. Antagonistic activity of dairy lactobacilli against gram-foodborne pathogens. *Acta Scientiarum. Technology* **2014**, 36(1), 1-6.
58. Alonso, S.; Castro, M.C.; Berdasco, M.; García de la Banda, I.; Moreno-Ventas, X.; Hernández de Rojas, A. Isolation and Partial Characterization of Lactic Acid Bacteria from the Gut Microbiota of Marine Fishes for Potential Application as Probiotics in Aquaculture. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **2019**, 11, 569–579.

59. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 32<sup>nd</sup>. CLSI supplement M100 (ISBN 978-1-68440-134-5 [Print]; ISBN 978-1-68440-2 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, USA. **2022**.
60. Tripathi, K.D. *Antimicrobial drugs, Section 12*. In: Tripathi (ed). *Assentials of Medical Pharmacology*. 8<sup>th</sup> Edition. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, New Deli, **2019**, pp. 739-906.
61. Rodrigues, L.; Fortes, L.L.; Durmaz, E.; Goh, Y.J.; Sanozky-Dawes, R.B.; Klaenhammer, T.R. Characterization of *Lactobacillus gasseri* isolates from a breast-fed infant. *Gut Microbes*. **2012**, 3(1), 15–24.
62. Xu, H.; Jeong, H.S.; Lee, H.Y.; Ahn, J. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letf. Appl. Microbiol.* 2009, 49, 434-442.
63. Sánchez-Ortiz, A.C.; Luna-González, A.; Campa-Córdova, A.I.; Escamilla-Montes, R.; Flores-Miranda, M.; Mazón-Suástegui, J.M. Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. *Latin American Journal of Aquatic Research* **2015**, 43(1), 123-136.
64. Kaushik, J.; Kumar, A.; Duary, R.K.; Mohanty, A.K.; Grover, S.; Batish, V.K. Functional and Probiotic Attributes of an Indigenous Isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PLoS ONE* **2009**, 4(12): e8099.
65. Klayraung, S.; Okonogi, S. Antibacterial and Antioxidant Activities of Acid and Bile Resistant Strains of *Lactobacillus fermentum* Isolated from Miang. *Braz J Microbiol.* **2009**, 40(4), 757-766.
66. Mortezaei, F.; Royan, M.; Allaf Noveirian, H.; Babakhani<sup>1</sup>, A.; Alaie Kordghashlaghi, H.; Balcazar, J.L. In vitro assessment of potential probiotic characteristics of indigenous *Lactococcus lactis* and *Weissella oryzae* isolates from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* **2020**, doi:10.1111/jam.14652.
67. Daza, C.; Campos, V.; Rojas, C.; Rodríguez-Llamazares, S.; Smith, C.; Mondaca, M. Reduction of selenite to elemental Selenium by *Pantoea agglomerans*. *Gayana* **2016**, 80, 67–74.
68. Oremland, R.S.; Herbel, M.J.; Switzer-Blum, J.; Langley, S.; Beveridge, T.J.; Ajayan, P.M.; Sutto, T.; Ellis, A.V.; Curran, S. Structural and spectral features of selenium

- nanospheres produced by Se-respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **2004**, 70, 52–60.
69. Dhanjal, S.; Cameotra, S.S. Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. *Microb. Cell Factories* **2010**, 9, 52.
70. Torres, S.K.; Campos, V.L.; León, C.G.; Rodríguez-Llamazares, S.M.; Rojas, S.M.; González, M.; Smith, C.T.; Mondaca, M.A. Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Pantoea agglomerans* and their antioxidant activity. *J. Nanoparticle Res.* **2012**, 14, 1236.
71. Wang, Q.; Garrity, G.M.; Tiedje, J.M.; Cole, J.R. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, 73, 5261-5277.
72. Campos, V. L., León, C., Mondaca, M. A., Yáñez, J., & Zaror, C. Arsenic mobilization by epilithic bacterial communities associated with volcanic rocks from Camarones River Atacama Desert Northern Chile. *Archives Environmental Contamination and Toxicology* **2011**, 61, 185–192.
73. Valenzuela, A.; Campos, V.; Yáñez, F.; Alveal, K.; Gutiérrez, P.; Rivas, M.; Contreras, N.; Klempau, A.; Fernandez, I.; Oyarzun, C. Application of artificial photoperiod in fish: A factor that increases susceptibility to infectious diseases? *Fish Physiol. Biochem.* **2012**, 38, 943–950.
74. Vera, B. Bio-Obtención de Nanopartículas de Selenio y su Potencial Aplicación Como Suplemento Alimentario Inmunoestimulante en Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Bachelor's Thesis, University of Concepcion, Concepción, Chile, March **2016**.
75. Brown, L.A. *Anaesthesia and restraint* In: Stoskopf M.K. (Ed.), *Fish Medicine*, W.B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich Inc., Philadelphia, USA. **1993**, pp. 79-90
76. Coyle, S.D.; Durborow, R.M.; Tidwell, J.H. Anesthetics in aquaculture. *Southern Regional Aquaculture Center (SRAC)* **2004**, 3900, 1–6.
77. Hu, Y.; Maisey, K.; Subramani, A.A.; Liu, F.; Flores-Kossack, C.; Imarai, M.; Secombes, C.J.; Wang, T. Characterisation of rainbow trout peripheral blood leucocytes prepared by hypotonic lysis of erythrocytes, and analysis of their phagocytic activity, proliferation and response to PAMPs and proinflammatory cytokines. *Developmental and Comparative Immunology* **2018**, 88, 104-113.

78. Anderson, D.; Siwicki, A. *Measuring the effects of contaminants on fish by haematological and serological methods*. In: Modulators of fish immune responses, Stolen, J., Anderson, D., Zelikoff, S., Twerdok, L., Kaattari, S., (eds). SOS Publications, Fair Haven NJ. **1993**, pp. 95-118.
79. Takemura, A.; Takano, K. Lysozyme in the ovary of tilapia (*Oreochromis mossambicus*): its purification and some biological properties. *Fish Physiology and Biochemistry* **1995**, 14(5), 415–421.
80. Lawrence, R.; Burk, R. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1976**, 71(4), 952-958.
81. Fontagne´-Dicharry, S.; Godin, S.; Liu, H.; Prabhu, P.A.J.; Bouyssière, B.; Bueno, M.; Tacon, P.; Médale, F.; Kaushik, S. Influence of the forms and levels of dietary selenium on antioxidant status and oxidative stress-related parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *British Journal of Nutrition* **2015**, 113, 1876-1887.
82. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* **1951**, 193(1), 265-275.
83. Naderi, M.; Keyvanshokoo, S.; Salati, A.P.; Ghaedi, A. Proteomic analysis of liver tissue from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under high rearing density after administration of dietary vitamin E and selenium nanoparticles. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genom. Proteom.* **2017**, 22, 10–19.
84. Lugert, V.; Thaller, G.; Tetens, J.; Schulz, C.; Krieter, J. A review on fish growth calculation: Multiple functions in fish production and their specific application. *Rev. Aquac.* **2014**, 8, 30–42.
85. Denev, S.; Staykov, Y.; Moutafchieva, R.; Beev, G. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *Int Aquat Res.* **2009**, 1(1), 1–29
86. Hai, N.V. The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology* **2015**, 119, 917–935.
87. Dawood, M.A.O.; Koshio, S.; Abdel-Daim, M.M.; Van Doan, H. *Reviews in Aquaculture* **2019**, 11(3), 907-924.
88. Valipour, A.; Nadaei, S.; Noori, A.; Khanipour, A.A.; Hoseinifar, S.H. Dietary *Lactobacillus plantarum* affected on some immune parameters, air-exposure stress response, intestinal microbiota, digestive enzyme activity and performance of narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*, Eschscholtz). *Aquaculture* **2019**, 504, 121-130.

89. Zhai, Q.; Wang, H.; Tian, F.; Zhao, J.; Zhang, H.; Chen, W. Dietary *Lactobacillus plantarum* supplementation decreases tissue lead accumulation and alleviates lead toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research* **2017**, 48(9), 5094-5103.
90. Silarudee, S.; Tongpim, S.; Charoensri, N.; Doolgindachbaporn, S. Effect of a Probiotic *Lactobacillus plantarum* CR1T5 Dietary Supplements on Non-specific Immunity in Black Eared Catfish (*Pangasius larnaudii*). *Journal of Pure and Applied Microbiology* **2019**, 13, 289-296.
91. Shakibaie, M.; Mohammadi-Khorsand, T.; Adeli-Sardou, M.; Jafari, M.; Amirpour-Rostami, S.; Ameri, A.; Forootanfar, H. Probiotic and antioxidant properties of selenium-enriched *Lactobacillus brevis* LSe isolated from an Iranian traditional dairy product. *J. Trace Elem. Med. Biol* **2017**, 40, 1–9.
92. Kang, S.; Li, R.; Jin, H.; You, H.J.; Ji, G.E. Effects of Selenium- and Zinc-Enriched *Lactobacillus plantarum* SeZi on Antioxidant Capacities and Gut Microbiome in an ICR Mouse Model. *Antioxidants* **2020**, 9(19), 1028.
93. Shu, G.; Mei, S.; Chen, L.; Zhang, B.; Guo, M.; Cui, X.; Chen, H. Screening, identification, and application of selenium-enriched *Lactobacillus* in goat milk powder and tablet. *Journal of Food Processing and Preservation* **2020**, 44(6), e14470.
94. Fečkaninová, A.; Koščová, J.; Mudroňová, D.; Schusterová, P.; Cingel'ová, I.; Maruščáková, C.; Popelka, P. Characterization of two novel lactic acid bacteria isolated from the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) in Slovakia. *Aquaculture* **2019**, 506, 294-301.
95. Savadogo, A.; Ouattara, C.; Bassole, I.; Traore, A. 2004. Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk. *Pakistan Journal of Nutrition* **2004**, 3(3), 174-179.
96. Tebyanian, H.; Bakhtiari, A.; Karami, A.; Kariminik, A. Antimicrobial Activity of some *Lactobacillus* Species against Intestinal Pathogenic Bacteria. *International Letters of Natural Sciences* **2017**, 65, 10-15.
97. Saulnier, D.M.; Spinler, J.K.; Gibson, G.R.; Versalovic, J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology* **2009**, 20(2), 135–141.

98. Shokryazdan, P.; Sieo, C.; Kalavathy, R.; Liang, J.; Alitheen, N.; Jahromi, M.; Ho, Y. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains. *Biomed Res Int.* **2014**, 927268.
99. European Food Safety Authority (EFSA). Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.* **2012**, 10, 2740.
100. Bujnakova, D.; Strakova, E. Safety, probiotic and technological properties of *Lactobacilli* isolated from unpasteurised ovine and caprine cheeses. *Annals of Microbiology* **2017**, 67, 813–826.
101. Rowe, G.E.; Welch, R.A. Assays of hemolytic toxins. *Methods Enzymol.* **1994**, 235, 657–67.
102. Ramachandran, G. Gram-positive and Gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. *Virulence* **2013**, 5, 213–218.
103. Yasmin, I.; Saeed, M.; Khan, W.A.; Khaliq, A.; Chughtai, M.F.J.; Iqbal, R.; Tehseen, S.; Naz, S.; Liaqat, A.; Mehmood, T.; Ahsan, S.; Tanwee, S.. In Vitro Probiotic Potential and Safety Evaluation (Hemolytic, Cytotoxic Activity) of Bifidobacterium Strains Isolated from Raw Camel Milk. *Microorganisms* **2020**(3), 354.
104. Sharma, K.; Sharma, N.; Sharma, R. Identification and evaluation of in vitro probiotic attributes of novel and potential strains of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products of North-West Himalayas. *J Clin Microbial Biochem Technol* **2016**, 2, 18–25.
105. Tokatlı, M.; Gülgör, G.; Bağder Elmaci, S.; Arslankoz İşleyen, N.; Özçelik, F. In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *Biomed Res Int.* **2015**, 315819.
106. Sica, M.G.; Brugnoli, L.I.; Marucci, P.L.; Cubitto, M.A. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming. *Antonie van Leeuwenhoek* **2012**, 101, 869–879.
107. Bravo, J.P.; Hernandez, A.J.; Morales, G.; Dantagnan, P.; Márquez, L. Digestive coordination of the gastric function in Atlantic salmon *Salmo salar* juveniles. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* **2018**, 46(5), 1083-1090.

108. Lückstädt, C. The use of acidifiers in fish nutrition. *CAB Rev Perspect Agric Veterinary*. **2008**, 3, 1–8.
109. Fečkaninová, A.; Koščová, J.; Mudroňová, D.; Popelka, P.; Toropilová, J. The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture. *Aquaculture* **2017**, 469, 1-8.
110. Iorizzo, M.; Albanese, G.; Letizia, F.; Testa, B.; Tremonte, P.; Vergalito, F.; Lombardi, S.J.; Succì, M.; Coppola, R.; Sorrentino, E. Probiotic Potentiality from Versatile *Lactiplantibacillus plantarum* strains as resource to enhance freshwater fish health. *Microorganisms* **2022**, 10(2), 463.
111. Fontana, L.; Brito, M.B.; Diaz, J.P.; Quezada, S.M; Gil, A. Sources, isolation, characterization and evaluation of probiotics. *Br J Nutr*. **2013**, 109, 35–50.
112. Begley, M.; Hill, C.; Gahan, C.G. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl Environ Microbiol*. **2006**, 72, 1729-1738.
113. Ravanal, J. Determinación de proteínas que participan en el control del tamaño de nanopartículas de selenio elemental producidas por *Pantoea agglomerans*. Bachelor's Thesis, University of Concepcion, Concepción, Chile, March **2015**.
114. Xia, S.K.; Chen, L.; Liang, J.Q. Enriched selenium and its effects on growth and biochemical composition in *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Agric. Food Chem*. **2007**, 55, 2413-2417.
115. Eszenyi, P.; Sztrik, A.; Babka, B.; Prokisch, J. Elemental, Nano-sized (100-500 nm) selenium production by probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinforma* **2011**, 1, 148-152.
116. Martínez, F.G.; Moreno-Martin, G.; Pescuma, M.; Madrid-Albarrán, Y.; Mozzi, F. Biotransformation of Selenium by Lactic Acid Bacteria: Formation of Seleno-Nanoparticles and Seleno-Amino. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2020**, 8, 506.
117. Ogasawara, Y.; Lacourciere, G.M.; Ishii, K.; Stadtman, T.C. Characterization of potential selenium-binding proteins in the selenophosphate synthetase system. *PNAS*. **2005**, 102(4), 1012-1016.
118. Daming, R.; Yingyu, W.; Zilai, W.; Jun, C.; Hekui, L.; Jingye, Z. Complete DNA sequence and analysis of two cryptic plasmids isolated from *Lactobacillus plantarum*. *Plasmid* **2003**, 50, 70-73.



119. Enferadi, M.H.N.; Mohammadzadeh, F.; Soltani, M.; Bahri, A.H.; Sheikhzadeh, N. Effects of *Lactobacillus plantarum* on Growth Performance, Proteolytic Enzymes Activity and Intestine Morphology in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **2018**, 18, 351-356.
120. Medina, M.; Sotil, G.; Flores, V.; Fernández, C.; Sandoval, N. In vitro assessment of some probiotic properties and inhibitory activity against *Yersinia ruckeri* of bacteria isolated from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Reports* **2020**, 18, 100447.
121. Pophaly, S. D., Singh, P., Kumar, H., Tomar, S. K., Singh, R. Selenium enrichment of lactic acid bacteria and bifidobacteria: a functional food perspective. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, 39, 135–145.
122. Javed, S.; Sarwar, A.; Tassawar, M.; Faisal, M. Conversion of selenite to elemental selenium by indigenous bacteria isolated from polluted areas. *Chem. Spec. Bioavailab.* **2015**, 27, 162–168.
123. Zhang, W.; Chen, Z.; Liu, H.; Zhang, L.; Gao, P.; Li, D. Biosynthesis and structural characteristics of selenium nanoparticles by *Pseudomonas alcaliphila*. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2011**, 88(1), 196-201.
124. Hosnedlova, B.; Kepinska, M.; Skalickova, S.; Fernandez, C.; Ruttkay-Nedecky, B.; Peng, Q.; Baron, M.; Melcova, M.; Opatrilova, R.; Zidkova, J.; Bjørklund, G.; Sochor, J.; Kizek, R. Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review. *Int J Nanomedicine* **2018**, 13, 2107–2128.
125. Uribe-Querol, E.; Rosales, C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front. Immunol.* **2020**, 11:1066.
126. Dalmo, R.A.; Ingebrigtsen, K.; Børgwald, J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *J. Fish Dis.* **1997**, 20, 241–273.
127. Rodríguez, A.; Esteban, M.A.; Meseguer, J. Phagocytosis and peroxidase release by seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes in response to yeast cells. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* **2003**, 272A, 415–423.
128. Soltani, M.; Abdy, E.; Alishahi, M.; Taheri Mirghaed, A.; Hosseini-Shekarabi, P. Growth performance, immune-physiological variables and disease resistance of common carp (*Cyprinus carpio*) orally subjected to different concentrations of *Lactobacillus plantarum*. *Aquacult Int.* **2017**, doi10.1007/s10499-017-0164-8.

129. Chen, L.; Pan, D-D.; Zhou, J.; Jiang, Y-Z. Protective effect of selenium-enriched lactobacillus on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in mice and its possible mechanisms. *World J Gastroenterol.* **2005**, 11(37), 5795–5800.
130. Saurabh, S.; Sahoo, P.K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research* **2008**, 39(3), 223-239.
131. Fast, M.D.; Simsa, D.E.; Burka, J.F.; Mustafa, A.; Ross, N.W. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **2002**, 132(3), 645-657.
132. Shang, X.; Wang, B.; Sun, Q.; Zhang, Y.; Lu, Y.; Liu, S.; Li, Y. Selenium-enriched *Bacillus subtilis* reduces the effects of mercury-induced on inflammation and intestinal microbes in carp (*Cyprinus carpio* var. *specularis*). *Fish Physiol Biochem.* **2022**, 48(1), 215-226.
133. Kane, A.M.; Soltani, M.; Ebrahimzahe-Mousavi, H.; Pakzad, K. Influence of probiotic, *Lactobacillus plantarum* on serum biochemical and immune parameters in vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against streptococcosis/lactococcosis. *Int. J. Aquat. Biol.* **2016**, 4(4), 285-294D.
134. Hang, B.T.; Balami, S.; Phuong, N.T. Effect of *Lactobacillus plantarum* on growth performance, immune responses, and disease resistance of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *AAFL Bioflux* **2022**, 15(1), 174-187.
135. Son, V.M.; Chang, C-C.; Wu, M-C.; Guu, Y-K.; Chiu, C-H.; Cheng, W. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology* **2009**, 26(5), 691-698.
136. Yanez-Lemus, F.; Moraga, R.; Mercado, L.; Jara-Gutierrez, C.; Smith, C.; Aguayo, P.; Sanchez-Alonzo, K.; García-Cancino, A.; Valenzuela, A.; Campos, L. Selenium nanoparticles biosynthesized by *Pantoea agglomerans* and their effects on cellular and physiological parameters in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Biology* **2022**, 11, 463.
137. Le, K.T.; Fotedar, R. Bioavailability of selenium from different dietary sources in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture* **2014**, 420–421, 57-62.

138. Dawood, M.A.O.; Zommara, M.; Eweedah, N.M.; Helal, A.I.; Aboel-Darag M.A. The potential role of nano-selenium and vitamin C on the performances of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) *Environ. Sci. Pollution Res.* **2020**, *27*, 9843-9852.
139. Lushchak, V.I.; Bagnyukova, T.V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **2006**, *144*(3), 283-289.
140. Magnoni, L.; Novais, S.C.; Silva, C.O.; Lemos, M.F.; Ozorio, R.; Geurden, I.; Leguen, I.; Prunet, P.; Eding, E.; Schrama, J. The impact of nutritional and environmental stressors on the immune response, oxidative stress and energy use of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR | International Meeting on Marine Research* **2016**. doi: 10.3389/conf.FMARS.2016.04.00008.
141. Mengistu, B.M.; Bitsue, H.K.; Huang, K. The Effects of Selenium-Enriched Probiotics on Growth Performance, Oocysts Shedding, Intestinal Cecal Lesion Scores, Antioxidant Capacity, and mRNA Gene Expression in Chickens Infected with *Eimeria tenella*. *Biological Trace Element Research* **2021**, *199*, 278–291.
142. Shang, X.; Xu, W.; Zhao, Z.; Luo, L.; Zhang, Q.; Li, M.; Sun, Q.; Gen, L. Effects of exposure to cadmium (Cd) and selenium-enriched *Lactobacillus plantarum* in *Luciobarbus capito*: Bioaccumulation, antioxidant responses and intestinal microflora. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **2022**, *257*, 109352.
143. Tollerz Bratteby, U. Factors Explaining Variation in the Fecundity of Female Baltic Salmon (*Salmo salar*)—The Influence of Length, Body Condition and Growth Rate at Sea. Master's Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Öregrund, Sweden. **2019**.
144. Melo-Bolívar, J.; Ruiz, R.; Hume, M.; Villamil, L.; Alzate, A.; Cañas, B.; Pérez-Munguia, S.; Hernandez-Mendoza, H.; Pérez-Conde, C.; Gutiérrez, A.M.; Cámara, C. Evaluation of the Inorganic Selenium Biotransformation in Selenium-Enriched Yogurt by HPLC-ICP-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9776–9783.
145. van Zyl, W.; Deane, S.; Dicks, L. Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. *Gut Microbes* **2020**, *12*(1), e1831339.
146. Ringø, E. Probiotics in shellfish aquaculture. *Aquaculture and Fisheries* **2020**, *5*, 1–27.
147. Van Doan, Hoseinifar, S.H.; Ringø, E.; Esteban, M.A.; Dadar, M.; Dawood, M.A.O.; Faggio, C. Host-Associated Probiotics: A Key Factor in Sustainable Aquaculture.

148. Jatobá, A.; Pereira, M. O.; Vieira, L.M.; Bitencourt, M.; Rodrigues, E.; Fachini, F.A.; Moraes, A. V. Action time and feed frequency of *Lactobacillus plantarum* for Nile tilapia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **2018**, 70(1), 327-332.
149. Parthasarathy, R.; Ravi, D. Probiotic bacteria as growth promoter and biocontrol agent against *Aeromonas hydrophila* in *Catla catla* (Hamilton, 1822). *Indian Journal of Fisheries* **2011**, 58(3), 87-93.
150. Giri, S.S.; Sukumaran, V.; Oviya, M. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunol* **2013**, 34(2), 660–666.
151. El-Kader, M.F.A.; El-Bab, A.F.F.; Abd-Elghany, M.F.; Abdel-Warith, A-W.A.; Younis, E.M.; Dawood, M.A.O. Selenium Nanoparticles Act Potentially on the Growth Performance, Hemato-Biochemical Indices, Antioxidative, and Immune-Related Genes of European Seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Biological Trace Element Research* **2021**, 199, 3126–3134.
152. Zhou, X.; Wang, Y.; Gu, Q.; Li, W. Effects of different dietary selenium sources (selenium nanoparticle and selenomethionine) on growth performance, muscle composition and glutathione peroxidase enzyme activity of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Aquaculture* **2009**, 291(1), 78–81.
153. Yang, L.; Wang, J.; Huang K.; Liu, Q.; Liu, G.; Xu, X.; Zhang, H.; Zhu, M. Selenium-enriched *Bacillus subtilis* yb-114246 improved growth and immunity of broiler chickens through modified ileal bacterial composition. *Scientific Reports* **2021**, 11, 21690.

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN GENERAL



## Discusión

En el Laboratorio de Microbiología Ambiental (LMA) de la UdeC se han elaborado varias investigaciones sobre Se<sup>0</sup>Nps [240, 241, 242, 243,] biosintetizadas por *P. agglomerans* UC-32 [240, 241, 242, 243] o *Lp. plantarum* [244] previo al término de este trabajo doctoral. El conocimiento generado en el LMA, en torno a las Se<sup>0</sup>Nps, ha permitido conocer, por ejemplo, que las Se<sup>0</sup>Nps biosintetizadas por *P. agglomerans* son susceptibles de ser funcionalizadas con L-Cys (Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys) y que este proceso permite la estabilización del tamaño de las partículas [240]. Torres *et al.* [201] evaluaron y compararon la toxicidad y actividad antioxidante de las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys y del Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> en la línea celular derivada de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) y reportaron una mayor viabilidad celular y una mayor actividad antioxidante en las células HUVEC co-cultivadas con Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys.

Ravanal [241], se centró en la detección de proteínas asociadas a la biosíntesis de Se<sup>0</sup>Nps por *P. agglomerans* y en la participación que estas podrían tener en el control del tamaño de las Nps. Esta autora concluyó que en la biosíntesis de las Se<sup>0</sup>Nps participarían proteínas involucradas en el control del tamaño de las Nps.

Daza *et al.* [242], determinaron la cinética de reducción del Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> y la localización celular de este proceso en *P. agglomerans*. Los autores concluyeron que esta bacteria es capaz de reducir el Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> bajo condiciones aeróbicas a Se<sup>0</sup> mediante una enzima que cataliza esta reducción a nivel citoplasmático.

Vera [243], evaluó el efecto de la suplementación dietaria con Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys o Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> por 15 días, sobre el nivel citoplasmático de ROS en fagocitos sanguíneos y la actividad de la lisozima en mucus cutáneo de trucha arcoíris. La autora reportó un no significativo mayor incremento del nivel de ROS en fagocitos y de la actividad de la lisozima en las truchas que consumieron el suplemento Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys.

Gajardo [244], aisló *Lactobacillus* sp, con propiedades probióticas y Se-reductoras desde el intestino de una trucha arcoíris. Luego, evaluó el efecto de la administración dietaria del *Lactobacillus* sp con potencial probiótico durante 7 días y reportó el incremento de la concentración de ROS en citoplasma de fagocitos sanguíneos y actividad de la lisozima en

mucus cutáneo. La autora no evaluó el efecto de una dieta suplementada con el *Lactobacillus* sp enriquecido con Se<sup>0</sup>Nps.

De la información generada en el LMA atinente a la línea de investigación de Se<sup>0</sup>Nps, destacamos los aportes de Vera [243] y Gajardo [244] pues constituyeron la base desde donde fue pensada la presente tesis.

A partir de i) la experiencia acumulada en la obtención de Se<sup>0</sup>Nps biosintetizadas por bacterias en el LMA y la posibilidad de realizar ensayos in vivo en un sistema de recirculación de agua con truchas arcoíris, dada a la vinculación científica entre el LMA y el Laboratorio de Piscicultura y Patología Acuática, UdeC, ii) la relevancia económica de la producción de salmónidos para nuestro país [245], iii) el incremento progresivo de la capacidad productiva de la industria salmonicultora nacional a expensas de una mayor intensidad de la producción [10], habitualmente asociada a estrés, EO e inmunosupresión, entre otros [246], iv) la situación ambiental crítica derivada de la actividad salmonícola como el uso indiscriminado de antibióticos y el deterioro del medio, v) la apertura que ha manifestado la industria salmonicultora nacional de incluir innovaciones en el proceso de producción para reducir las concentraciones de antibióticos e impacto ambiental [14], como por ejemplo las Se<sup>0</sup>Nps Filipović *et al.* [247] y vi) los resultados promisorios obtenidos en el LMA en este campo, es que consideramos como una oportunidad científica y productivamente interesante, el profundizar en el estudio de los efectos de las Se<sup>0</sup>Nps como suplemento nutricional para peces salmónidos en cultivo.

Plateamos que la alimentación de truchas arcoíris con una dieta suplementada con Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys o LAB-Se<sup>0</sup>Nps, durante 30 días, determinaría una mayor respuesta antioxidante e inmunológica y mejoraría índices productivos en relación con la alimentación de los peces con una dieta suplementada con Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> o LAB con potencialidad probiótica no enriquecidas con Se<sup>0</sup>.

Obtuvimos Se<sup>0</sup>Nps biosintetizadas por *P. agglomerans* UC-32 que luego fueron funcionalizadas con L-Cys (Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys). El uso de L-Cys como agente funcionalizante de Nps de distinto origen químico, ha sido reportado en varios estudios [248-250] que indican que este aminoácido cubre a las Nps formando una capa que favorece la obtención de partículas más pequeñas que las Nps no funcionalizadas. En acuerdo con estos estudios, las

Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys fueron significativamente más pequeñas que las Se<sup>0</sup>Nps. Perni *et al.* [251] señalan que la L-Cys reduciría la energía de la superficie de las Nps promoviendo la separación entre éstas, evitando la aglomeración.

La elección de un agente funcionalizante debería estar relacionada con la aplicación que se le dará a las Nps. Para aplicaciones biológicas, han sido sugeridos polipéptidos (glutación) [252], tiopronina [253] y aminoácidos [213, 215, 217, 221] como la Cys. La característica común entre los agentes funcionalizantes usados para fines biológicos, es la presencia de S en su composición. El S tiene una alta afinidad con el Se, demostrada naturalmente dada la conformación de moléculas orgánicas como la SeCys, en la que la Cys se une al Se mediante grupos tiol (-SH) [222]. Según Perni *et al.* [215], la alta afinidad de la L-Cys a la superficie de la Se<sup>0</sup>Nps promueve la cobertura y consecuente mayor estabilidad de esta, determinando la obtención de Nps de menor tamaño.

Las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys fueron mejores secuestradoras de ROS que el Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, de acuerdo con tres ensayos in vitro: DPPH, FRAP y TRAP. Sin embargo, la capacidad antioxidante de las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys y el Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> fue significativamente menor que los controles positivos, la vitamina C, Trolox y NAC, concordando con Forootanfar *et al.* [254] quienes observaron una capacidad antioxidante significativamente menor de las Se<sup>0</sup>Nps biosintetizadas por *Bacillus* sp. MSh-1 y del SeO<sub>2</sub>, en comparación con el control positivo hidroxitolueno butilado (BHT). De igual forma Huang *et al.* [216], reportaron una mayor capacidad antioxidante de las Se<sup>0</sup>Nps producidas a partir de la reducción del Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> por la albúmina sérica de bovino (BSA), en comparación al Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. Estos autores indicaron, además, que la capacidad antioxidante de las Se<sup>0</sup>Nps es inversamente proporcional a su tamaño. Dumore & Mulkhopadhyay [255] reportaron una alta capacidad antioxidante de Se<sup>0</sup>Nps químicamente sintetizadas y funcionalizadas con grupos hidroxilos (OH<sup>-</sup>), medida a través de ensayo DPPH, indicando que la carga eléctrica de la superficie de las Se<sup>0</sup>Nps jugaría un rol relevante en la capacidad antioxidante.

Evaluamos el efecto tóxico y antioxidante de 160, 320 o 640 nM de Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys o Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> en las líneas celulares RTgill-W1 y RTS11 y en cultivo primario T-PHKM de trucha arcoíris por 24 h a 20 °C. Constatamos una viabilidad celular significativamente mayor en los tres cultivos celulares que fueron co-cultivados con Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys comparado con la viabilidad observada en RTgill-W1, RTS11 y T-PHKM con-cultivadas con Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. Estos



resultados concuerdan con lo reportado por Torres *et al.* [240], quienes registraron una disminución significativamente mayor de la concentración de ROS intracelular en células HUVEC, sometidas a D-glucosa como agente inductor de ROS, cuando fueron co-cultivadas con 320 nM Se<sup>0</sup>Nps/L-cys en comparación con lo observado en el co-cultivo con Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>.

Sin embargo, Zhang *et al.* [233] y Wang *et al.* [229], reportaron una mayor toxicidad de las Se<sup>0</sup>Nps en comparación a Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, en la línea celular derivada de hepatoma humano (HepG2) y en modelo *in vivo* utilizando ratones Kunming, respectivamente. De acuerdo con lo descrito por Mal *et al.* [256], las discrepancias en cuanto a toxicidad por las Se<sup>0</sup>Nps en diferentes modelos de estudios, estaría relacionada con la composición del medio, el tamaño de las partículas, el agente funcionalizante usado y el tipo de organismo o célula involucrada en el estudio.

En cuanto a la participación del agente funcionalizante, en resultados de viabilidad celular con Nps, Sandmann *et al.* [257], reporta que la Cys como agente funcionalizante favorece la dispersión de las Nps de Zn en medio acuoso. Arathi *et al.* [250], agrega que la dispersión de las Nps es un factor de disminución de toxicidad.

En cuanto al tipo de organismo o célula involucrada en el estudio como factor de discrepancias entre los efectos tóxicos de las Se<sup>0</sup>Nps, al comparar la viabilidad entre T-PHKM y RTgill-W1, el primero mostró una mayor generación de ROS citoplasmático que RTgill-W1, sin embargo, en la última, se constató un menor porcentaje de sobrevida celular. Krumschnabel *et al.* [258] compararon la viabilidad celular de RTgill-W1 con un cultivo primario de hepatocitos de trucha arcoíris frente a un agente inductor de respuesta oxidativa celular. Los autores, al igual que nosotros, concluyeron que, si bien el cultivo primario presentó una mayor producción de ROS que RTgill-W1, en la línea celular derivada de branquias se observó una mayor mortalidad celular.

También evaluamos el efecto antioxidante de las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys en RTgill-W1, RTS11 y T-PHKM a las que, luego de ser co-cultivadas con 160, 320 o 640 nM de Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys o Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> por 18 h a 20° C les fue reemplazado el medio de cultivo por uno fresco conteniendo 100, 150 o 300 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 h a 20° C como inductor de EO. Determinamos la viabilidad celular y la concentración citoplasmática de ROS en cada tipo celular.

Las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys tuvieron un mejor desempeño que Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, favoreciendo una mayor viabilidad celular y una reducción de la concentración de ROS citoplasmático en RTgill-W1, RTS-11 y T-PHKM de forma dosis dependiente. El pretratamiento de los cultivos celulares con 640 nM de Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys tuvo el mejor desempeño como atenuador de EO en los tres tipos celulares. De acuerdo con Mou *et al.* [259], el EO causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en la línea celular derivada de melanocitos determina alteraciones metabólicas que influirían incrementando la tasa de apoptosis.

Liu *et al.* [260], reportan que las Se<sup>0</sup>Nps funcionalizadas con phycocyanin redujeron la concentración de ROS intracelular y disminuyeron la disfunción mitocondrial causada por ROS en línea celular INS-1E, derivada de cáncer pancreático de rata. De igual forma, Yu *et al.* [261] obtuvieron Se<sup>0</sup>Nps biosintetizadas por *Lactobacillus casei* ATCC 393 que incrementaron la viabilidad celular y disminuyeron la concentración de ROS citoplasmático en la línea celular de células epiteliales del intestino de cerdo IPEC-J2 inducido con 500 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos autores también reportaron un incremento del nivel de ATP disponible y del potencial de membrana mitocondrial.

El efecto protector de las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys contra EO en RTgill-W1, sugiere que podrían contribuir a disminuir los efectos de sustancias oxidativas presentes en agua que puedan alterar el funcionamiento de las branquias. De acuerdo con Franco *et al.* [262] y Bopp *et al.* [263] las RTgill-W1 presenta una mayor sensibilidad frente al aumento de ROS citoplasmático cuando es comparada con otras líneas celulares probablemente debido a la mayor tendencia a la fragmentación del DNA como consecuencia de la oxidación del material genético. Cabe señalar, que los insecticidas son los contaminantes acuáticos más comunes del mundo, capaces de producir múltiples alteraciones orgánicas en distintas especies de peces, produciendo principalmente genotoxicidad y apoptosis tanto en branquias como el hígado, debido al daño oxidativo [264]. Tkachenko *et al.* [265] investigaron el efecto de la vacunación sobre el estado oxidativo en la trucha arcoíris, concluyendo que las actividades de las enzimas antioxidantes Gpx y glutatión reductasa (GR) disminuyeron significativamente en la musculatura esquelética y las branquias sugiriendo que la vacunación podría generar EO en estos animales, por lo que las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys podrían llegar a minimizar los efectos negativos de la vacunación, que es un procedimiento regular en la salmonicultura.

Por otro lado, aislamos 16 cepas bacterianas desde el contenido intestinal de truchas arcoíris en las que se ensayó diferentes pruebas con vistas a seleccionar aquellas con características de bacterias ácido-lácticas con potencialidad probiótica y biosintetizadoras de Se<sup>0</sup>Nps. *Lactiplantibacillus plantarum* S14 (LABS14) fue la única bacteria que cumplió con los criterios de selección establecidos, siendo capaz de sintetizar Nps de entre 98 a 245 nm de diámetro (LABS14-Se<sup>0</sup>Nps) que, de acuerdo con observaciones en TEM y SEM, una vez sintetizadas se mantienen adheridas a la superficie externa de la pared bacteriana, razón por la cual, en el presente trabajo *Lp. plantarum* S14 fue usada como vehículo de Se<sup>0</sup>Nps.

*Lp. plantarum*, previamente denominada *Lactobacillus plantarum* ha sido usada como bacteria probiótica [266] y biosintetizadora de Se<sup>0</sup>Nps [267]. Yazdi *et al.* [239] y Kheradmand *et al.* [268] informaron tamaños de Se<sup>0</sup>Nps producidas por esta especie de aproximadamente 250 nm y entre 25 y 250 nm, respectivamente.

Para los ensayos in vivo, las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys y las LABS14-Se<sup>0</sup>Nps fueron utilizadas en ensayos independientes como suplemento nutricional en truchas arcoíris, durante 30 días.

Se evaluó el efecto de la suplementación dietaria en algunos parámetros de:

- La respuesta inmune innata, como la actividad de la lisozima plasmática y la concentración de ROS en células fagocíticas sanguíneas.
- Estado oxidativo, mediante la determinación de la actividad de la enzima antioxidante Gpx en plasma, hígado y músculo dorsal.
- Desarrollo corporal y sobrevivencia, usados como indicadores productivos por la industria salmonicultora.

Tanto las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys como las LABS14-Se<sup>0</sup>Nps administradas como suplemento nutricional determinaron un mayor incremento de los índices de los parámetros señalados en comparación con los obtenidos de la administración dietaria de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> o LABS14, respectivamente. Los métodos usados para la determinación in vivo del efecto de las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys o de las LABS14-Se<sup>0</sup>Nps en la trucha arcoíris, fueron los mismos.

La lisozima, también conocida como muramidasa, es una enzima producida por los neutrófilos y los macrófagos que luego es secretada a la sangre y el moco para ejercer efectos

bacteriolíticos catalizando la hidrólisis de las uniones beta 1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina en el peptidoglican. La lisozima es considerada uno de los factores inmunitarios no específicos más importantes de los peces y su nivel y actividad en estos animales depende, entre otros, del estado nutricional [269].

En el presente trabajo, a partir del día 15 y hasta el término del ensayo (día 30) se observó una mayor actividad de esta enzima en el grupo de peces que consumió Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys comparada con la actividad registrada en los grupos de peces que recibieron Se<sup>0</sup>Nps o Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> y el grupo control. En orden decreciente, la actividad de la lisozima plasmática por tratamiento dietario fue Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys > Se<sup>0</sup>Nps > Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> > control.

Por otra parte, igualmente el día 15, el grupo de peces que consumió la dieta suplementada con LABS14-Se<sup>0</sup>Nps (D1) también mostró una actividad de la lisozima mayor que lo registrado en el grupo que consumió LABS14 en el alimento (D2) y el grupo control (AD). El día 30 de experimentación, el grupo de peces que consumió D1 se mantuvo como el grupo con la mayor actividad de la lisozima, pero, de forma significativa, únicamente respecto del control, puesto que el grupo alimentado con D2 igualmente mostró un incremento de la actividad de la lisozima significativamente mayor que la registrada en el grupo control. En orden decreciente, la actividad de la lisozima plasmática por tratamiento dietario fue D1 > D2 > AD.

El aumento de la actividad de lisozima plasmática en peces puede estar asociado a una mayor tasa de proliferación de células fagocíticas o al aumento en el número de lisosomas [270]. Kohshahi *et al.* [158] informaron el incremento significativamente mayor de la actividad de la lisozima en truchas arcoíris alimentadas con una dieta suplementada con Se<sup>0</sup>Nps comparada con truchas a las que se les dio dieta suplementada con Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. Harsij *et al.* [271] también informaron un aumento significativo de la lisozima plasmática en la trucha arcoíris que consumieron Se<sup>0</sup>Nps sintética combinada con vitaminas C y E. De igual forma, el uso de Se<sup>0</sup>Nps como suplemento alimenticio en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) incrementó significativamente la actividad de la lisozima plasmática en comparación con el grupo control (sólo alimento) y el grupo que consumió Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> como suplemento dietario [272].

El efecto de la suplementación dietaria con *Lp. plantarum* sobre la actividad de la lisozima sanguínea ha sido demostrado en la trucha arcoíris [273], el bagre rayado (*Pangasianodon hypophthalmus*) [274] y el mero de manchas naranjas (*Epinephelus coioides*) [275]. Hasta donde sabemos, no hay otros informes relacionados con el efecto combinado de *Lp. plantarum* y Se<sup>0</sup>Nps sobre la actividad de la lisozima en vertebrados. Sin embargo, Shang *et al.* [276] reportó una actividad de la lisozima significativamente más alta en carpas (*Cyprinus carpio var. specularis*) alimentadas con una dieta suplementada con el probiótico *Bacillus subtilis* enriquecido con Se<sup>0</sup> (de ubicación citoplasmática), comparada con en el grupo control (sólo alimento), después de que los peces fueran expuesto a Hg por 30 días.

Lo anterior sugiere que: i) las Se<sup>0</sup>Nps, ya sean sintetizadas por *P. agglomerans* UC-32 o *Lp. plantarum* S14 inciden en la actividad de la lisozima plasmática, ii) que la cepa LABS14 probablemente tuvo un rol como probiótico durante el tiempo de experimentación, similar al reportado por Soltani *et al.* [273], quienes informaron del incremento de la actividad de la lisozima sanguínea en la trucha arcoíris alimentada con una dieta suplementada con el probiótico *Lp. plantarum* 426951 durante 60 días y que iii) las Se<sup>0</sup>Nps biosintetizadas por LABS14 y la posible acción probiótica de LABS14 actuaron de forma combinada en el incremento de la actividad de la lisozima plasmática en la trucha arcoíris.

Con respecto a la producción de ROS por parte de leucocitos sanguíneos de la trucha arcoíris, esta fue evaluada mediante la reducción de NBT. La generación de ROS en estas células del sistema inmune se enmarca en el estallido respiratorio como mecanismo de destrucción de patógenos durante la fagocitosis [277].

Los resultados mostraron que los leucocitos de las truchas arcoíris alimentadas con la dieta suplementada con Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys tuvieron un incremento mayor en la concentración de ROS citoplasmático el día 30 de experimentación, en comparación con los otros grupos. En los reportes de Dawood *et al.* [278] y Xia *et al.* [279] igualmente se constata un incremento del estallido respiratorio en leucocitos de *O. niloticus* y *Danio rerio*, respectivamente, alimentados durante 8 semanas [278] y 9 días [279] con dietas enriquecidas con Se<sup>0</sup>Nps sintetizadas químicamente.

Dawood *et al.* [280] informaron que, además del incremento de ROS citoplasmático involucrado en el proceso de fagocitosis, el enriquecimiento de la dieta con Se<sup>0</sup>Nps incremento la eficiencia de la activación del complemento por vía alternativa y un aumento de actividad de la lisozima en *Pagrus major*. Ayoub *et al.* [281] reportaron que en *O. niloticus*, se registró una mayor actividad de la lisozima sérica y del estallido respiratorio dada la administración dietaria de 1 a 2 mg Se<sup>0</sup>Nps kg<sup>-1</sup> de materia seca de alimento. Abd El-Kader *et al.* [282] y Abd El-Kader *et al.* [283] indicaron el aumento de la hemoglobina, del número neto de glóbulos rojos, del número de leucocitos, de la concentración de globulina sérica total, del índice fagocítico y de la actividad de la lisozima. Kumar *et al.* [284] informaron que *Pangasianodon hypophthalmus* alimentados con Se<sup>0</sup>Nps incluidas en la dieta (0,5 mg Se<sup>0</sup>Nps kg<sup>-1</sup> materia seca de alimento) aumentó el estallido respiratorio, los niveles de acetilcolina esterasa, la inmunoglobulina total, la mieloperoxidasa, la globulina y redujo el cortisol sérico, la peroxidación lipídica y la glucosa en sangre.

Por su parte, los resultados obtenidos en cuanto a concentración de ROS en leucocitos de la trucha arcoíris alimentadas con D1 o D2, registramos un incremento significativamente mayor de la concentración de ROS en los leucocitos de los peces alimentados con D1 o D2 desde el día 15 y hasta el término del ensayo (día 30). Al respecto, Soltani *et al.* [285] demostró que la administración dietaria de *Lp plantarum* igualmente incrementó la concentración de ROS en neutrófilos de la carpa común (*Cyprinus carpio*). Por su parte, Chen *et al.* [286], mostró una alta capacidad fagocítica potencial de macrófagos de ratones alimentados con *Lactobacillus* sp que contenía Se<sup>0</sup> intracitoplasmático. Estos autores concluyeron que la magnitud del índice fagocítico dependió de la concentración de Se<sup>0</sup> en citoplasma de *Lactobacillus* sp, la que además fue ligada a la protección de la membrana citoplasmática de los leucocitos frente a agentes oxidativos.

Lo anterior sugiere que: i) las Se<sup>0</sup>Nps, ya sean sintetizadas por *P. agglomerans* UC-32 o *Lp. plantarum* S14 inciden en la generación de ROS por leucocitos como parte de un mecanismo dirigido a destruir microorganismos a través de la fagocitosis, ii) que la cepa LABS14 tuvo un rol como probiótico durante el tiempo de experimentación, similar al reportado por Zhao *et al.* [287] quienes probaron que la cepa probiótica *Lp. plantarum* RS-09 incrementó significativamente el estallido respiratorio de macrófagos obtenidos de ratones BALB/C y iii) LABS14 y las Se<sup>0</sup>Nps habrían ejercido un efecto combinado que mejoró

potencialmente la capacidad destructiva de microorganismos a través de la fagocitosis respecto de LABS14 y el grupo control.

Los organismos cuyas células dependen de un metabolismo aerobio, han desarrollado una variedad de sistemas de defensa antioxidante que constantemente interfiere con los ROS en los tejidos, con el propósito de que estos no interactúen con estructuras orgánicas susceptibles de ser oxidadas como los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, entre otros, y así evitar un mal funcionamiento celular y la consiguiente presentación de enfermedades [288].

La mantención de un adecuado sistema antioxidante en los peces es importante tanto en aquellos de vida libre como en los destinados a la producción. A este respecto, la Gpx constituye una familia de enzimas antioxidantes que protegen al organismo del daño oxidativo, catalizando la reducción del  $H_2O_2$  e hidroperóxidos orgánicos [289]. Magnoni *et al.* [290] indica que los estresores ambientales causarían un incremento de los ROS tisulares pudiendo determinar EO, la supresión de la respuesta inmune y antioxidante y la alteración de vías metabólicas que reduzcan la producción de energía en la trucha arcoíris.

Evaluamos la actividad de la Gpx en plasma, hígado y músculo dorsal en truchas arcoíris alimentadas con dietas suplementadas con  $Se^0Nps/L-Cys$  o LABS14- $Se^0Nps$  por 30 días. Para el ensayo ligado a las  $Se^0Nps/L-Cys$ , se observó una actividad de la Gpx significativamente más alta en los grupos de peces a los que les fue administrado  $Se^0Nps$  o  $Na_2SeO_3$ , respecto del grupo control. Los peces que consumieron  $Se^0Nps/L-Cys$  mostraron un incremento de la actividad de esta enzima significativamente mayor en el plasma, hígado y músculo dorsal comparado con el grupo alimentado con dieta suplementada con  $Se^0Nps$  o  $Na_2SeO_3$ .

Los resultados sugieren que el enriquecimiento de la dieta con  $Se^0Nps/L-Cys$  induciría una mejor capacidad del sistema antioxidante para contrarrestar el efecto de ROS en los tejidos de la trucha arcoíris porque favorecería una mayor actividad de la Gpx, tal como informó Saffari *et al.* [291] quienes registraron un incremento significativamente mayor de la actividad de la Gpx en *C. carpio* alimentadas con dieta enriquecida con  $Se^0Nps$  en comparación con las carpas que consumieron  $Na_2SeO_3$  como suplemento nutricional. Por su parte, Naderi *et al.* [292] informaron de una actividad Gpx significativamente más alta en el tejido hepático de la trucha arcoíris con dieta enriquecida con  $Se^0Nps$ , sintetizada

químicamente, que la actividad Gpx registrada en los animales del grupo control. Khan *et al.* [50] indicaron que la administración dietética de Se<sup>0</sup>Nps aumentó significativamente la actividad de Gpx en el hígado y los tejidos musculares de los juveniles de *Tor putitora* en comparación con el control.

En cuanto al efecto de la suplementación dietara con las LABS14-Se<sup>0</sup>Nps sobre la actividad de la Gpx en plasma, hígado y músculo dorsal de la trucha arcoíris, la dieta D1 determinó una mayor actividad de Gpx en plasma, hígado y músculo de la trucha arcoíris en comparación con las dietas D2 o AD, lo que sugiere un efecto combinado de la cepa LABS14 y las Se<sup>0</sup>Nps producidas por la bacteria sobre la actividad de Gpx tisular. Chen *et al.* [286] informó que la suplementación de alimentos destinado a ratones con *Lactobacillus* sp enriquecido con Se (mineral en citoplasma bacteriano) mejoró la actividad Gpx de una manera dosis-dependiente; a mayor concentración de Se citoplasmático, mayor actividad enzimática. Además, Mengistu *et al.* [293] igualmente informaron de un efecto combinado de Se y *Lactobacillus acidophilus* administrados en la dieta de pollos durante 42 días. Los autores determinaron un aumento significativo de la expresión de ARNm de Gpx1, Gpx4, Se-proteína W e IFN $\gamma$  en comparación con la expresión de ARNm en grupos de pollos alimentados con dieta suplementada solamente con *L. acidophilus* o SeO<sub>3</sub> y el grupo control (alimento no suplementado). Shang *et al.* [276] también demostraron un aumento de la actividad de Gpx en juveniles de *Luciobarbus capito* utilizando *Lp. plantarum* enriquecido con Se como suplemento nutricional. Estos autores no precisaron la forma de Se presente en el citoplasma de *Lp. plantarum*.

Lo anterior sugiere igualmente que: i) las Se<sup>0</sup>Nps, ya sean sintetizadas por *P. agglomerans* UC-32 o *Lp. plantarum* S14 inciden en el incremento de la actividad de la Gpx mejorando el estado antioxidante de la trucha arcoíris, ii), la cepa LABS14 tuvo un rol como probiótico durante el tiempo de experimentación, similar a lo reportado por Sagada *et al.* [294] quienes incluyeron la cepa probiótica *Lp. plantarum* L-137 como suplemento nutricional durante 8 semanas de experimentación y observaron un incrementó significativamente mayor la actividad de la Gpx hepática en el pargo negro (*Acanthopagrus schlegelii*) respecto del control y que iii) la cepa LABS14 y las Se<sup>0</sup>Nps habrían ejercido un efecto combinado que mejoró potencialmente la capacidad antioxidante de la trucha arcoíris en relación con las otras fuentes de Se testeados en este trabajo.



El uso de Se<sup>0</sup>Nps como un suplemento nutricional también ha mejorado la actividad de otras enzimas antioxidantes, tal como ha sido reportado por Longbaf Dezfouli *et al.* [49] quienes informaron que 4 mg Se<sup>0</sup>Nps kg<sup>-1</sup> de materia seca de alimento administrados a la de lubina asiática (*Lates calcarifer*) determinó un incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes Gpx, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Dawood *et al.* [295] igualmente informaron que las Se<sup>0</sup>Nps como suplemento nutricional incrementaron la actividad de la CAT en *Pagrus major*. En la tilapia del Nilo, la administración dietaria de Se<sup>0</sup>Nps habría incrementado la actividad de las enzimas Gpx, SOD y CAT [25]. Ghazi *et al.* [296], reportaron que las Se<sup>0</sup>Nps en la dieta de la tilapia del Nilo incrementó las actividades de SOD y CAT y redujo la concentración de malondialdehído (MDA). En la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), Abd El-Kader *et al.* [282] y Abd El-Kader *et al.* [283] reportaron un incremento de la actividad de SOD y CAT y una reducida concentración de MDA tisular, sugerente de una baja peroxidación lipídica en peces tratados con 0,5 a 1 mg Se<sup>0</sup>Nps kg<sup>-1</sup> materia seca de alimento.

Respecto del efecto de las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys sobre índices de crecimiento y sobrevivencia en la trucha arcoíris, se registró un mayor peso final (FW), mayor ganancia de peso (WG) y una mayor tasa de crecimiento específico (SGR) en las truchas que fueron alimentadas con Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys por 30 días, sin embargo, la diferencia en los valores obtenidos fue no significativa respecto de los otros grupos experimentales y el grupo control. Por su parte, el factor de condición final (FCF) fue significativamente mayor que el FCF registrado para los grupos Se<sup>0</sup>Nps, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> y control. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Naderi *et al.* [297] quienes evaluaron el efecto de la suplementación dietaria con Se<sup>0</sup>Nps sobre SGR y otros parámetros productivos en la trucha arcoíris. Por su parte, Harsij *et al.* [298] reportaron un incremento significativamente mayor de la tasa de crecimiento en truchas arcoíris juveniles expuestas a concentraciones subletales de amonio y a la vez alimentadas con una mezcla de suplementos nutricionales compuesta por Se<sup>0</sup>Nps y las vitaminas C y E, comparada con las tasas de crecimiento del grupo control (exposición a amonio). Estos autores postularon que la combinación de los suplementos que integraron la dieta habría favorecido la síntesis de la Se-enzima deiodinasa, involucrada en la liberación de la hormona del crecimiento, sintetizada en la glándula pituitaria en vertebrados, incluyendo los peces.

Cabe señalar que el FCF cuando es superior a 1,00 representaría una buena condición de salud o bienestar, correlacionándose con una adecuada tasa de fertilidad que involucra gametos de buena calidad [299,300]. Nuestros resultados sugieren que el efecto de la suplementación dietaria con Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys, cuando es comparada con el efecto de la suplementación con Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> favorecería la acumulación de reservas energéticas corporales.

Respecto de la administración dietaria de D1 y D2 se observó que mejoraron significativamente todos los índices evaluados en comparación con el AD. El crecimiento de las truchas alimentadas con D1 fue mayor que el crecimiento de los peces alimentados con D2, aunque la diferencia fue no significativa. El FCF en los 3 grupos (D1, D2 y AD) fue superior a 1,00. Nuestros resultados sugieren un efecto combinado de la cepa LABS14 y Se<sup>0</sup>Nps en los procesos fisiológicos involucrados en el crecimiento de la trucha arcoíris. La dieta D1 puede favorecer una mayor eficiencia de la trucha arcoíris en la acumulación de reservas energéticas.

Lo anterior sugiere igualmente que: i) las Se<sup>0</sup>Nps, ya sean sintetizadas por *P. agglomerans* UC-32 o *Lp. plantarum* S14 inciden favorablemente en índices de crecimiento de la trucha arcoíris, ii), la cepa LABS14 tuvo un rol como probiótico durante el tiempo de experimentación tal como fue reportado por Van Doan [315] quienes observaron un incremento de la tasa de crecimiento en *Pangasius bocourti*, alimentados con dieta que contuvo 10<sup>8</sup> CFU de *Lp. plantarum* por g de materia seca de alimento y que iii) la cepa LABS14 y las Se<sup>0</sup>Nps habrían ejercido un efecto combinado que mejoró potencialmente la capacidad antioxidante de la trucha arcoíris en relación con las otras fuentes de Se testeados en este trabajo.

Considerando que los ensayos dirigidos a evaluar el efecto de las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys o de las LABS14-Se<sup>0</sup>Nps tuvieron un desfase de alrededor de un año y ciertas variables, por ejemplo, la composición del agua utilizada en cada ensayo no fue analizada, queremos ser cautos en establecer una comparación. Así, al observar las diferencias entre los índices registrados, ligados al crecimiento y los respectivos controles por ensayo (Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys o LABS14-Se<sup>0</sup>Nps) podemos estimar que el efecto combinado de las Se<sup>0</sup>Nps y su vehículo *Lp. plantarum* S14 como suplemento nutricional, fue más eficaz incrementando las tasas de crecimiento que la suplementación dietética con Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys.

Las bacterias probióticas pueden proteger el epitelio intestinal del establecimiento y proliferación de microorganismos patógenos, compitiendo por superficies susceptibles de ser colonizadas, favoreciendo así, la captación y absorción de nutrientes dada la integridad de los enterocitos [301]. La colonización y proliferación de un microorganismo patógeno en el epitelio intestinal, determina la alteración mecánica y funcional de los enterocitos, que lleva a la instauración de un proceso inflamatorio que implica la presencia de células inflamatorias y edema en el sitio de establecimiento del patógeno. Esto implica entre otros, una disminución de la capacidad de absorción de nutrientes [302]. De esta forma, la disminución de la tasa de invasión de microorganismos patógenos en el intestino favorece la absorción y por ende la biodisponibilidad de nutrientes como vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos y minerales.

El uso de dietas suplementadas con *Lp. plantarum* ha permitido mejorar la eficiencia de utilización de nutrientes impactando positivamente en las tasas de crecimientos de varias especies de peces [274, 303-306]. Soltani *et al.* [285] registraron la mejora de parámetros inmunológicos lograda al suministrar *Lp. plantarum* en la dieta, resultando en mayores tasas de crecimiento para la trucha arcoíris.

Por su parte, el Se dietario es esencial para la estimulación de la producción de la hormona del crecimiento, lo que favorece un mayor rendimiento de crecimiento en los peces [307], tal como ha sido informado en algunas especies de peces como *D. labrax* [283], *O. niloticus*) [308] y *C. auratus gibelio* [309], entre otros. La deiodinasa regula la conversión de la hormona tiroidea inactiva (tiroxina, T4) en una hormona tiroidea metabólicamente activa (3,5,3'-triyodotironina, T3). La concentración sérica elevada de T3 promueve la síntesis de la hormona del crecimiento en los peces [310, 311], aumentando así, la tasa de crecimiento [312]. Al respecto, Khan *et al.* [312] reportaron que en *Tor putitora* alimentada con Se<sup>0</sup>Nps en la dieta se determinó un aumento en los niveles de la hormona del crecimiento. La lubina asiática (*L. calcarifer*) alimentada con 4 mg Se<sup>0</sup>Nps kg<sup>-1</sup> materia seca de alimento, mostró una mayor tasa de WG que los peces del grupo control (sólo alimento) en un ensayo de 6 semanas de duración [313]. Dawood *et al.* [295] informaron que en pargos japonés (*Pagrus major*) alimentados con 1 mg Se<sup>0</sup>Nps kg<sup>-1</sup> materia seca de alimento mejoró la tasa de crecimiento y la utilización del alimento. Los autores correlacionaron el mayor crecimiento de los peces alimentados con Se<sup>0</sup>Nps a la mayor activación de proteasas intestinales que resultó en una mayor tasa de absorción intestinal de nutrientes.

De acuerdo con los estudios previamente señalados, es posible relacionar el uso de Se<sup>0</sup>Nps con un incremento en los índices de crecimiento en distintas especies de peces. Las Se<sup>0</sup>Nps activarían enzimas digestivas y favorecerían la integridad de las vellosidades intestinales [314]. Un estudio realizado por Ghazi *et al.* [296] reveló que el uso dietario de Se<sup>0</sup>Nps en *O. niloticus* incrementó la longitud de las vellosidades intestinales e incrementó el número de células caliciformes. Estos autores, señalaron que el incremento de los índices de desarrollo en los peces fue la consecuencia del mejoramiento de la estructura del epitelio intestinal, favoreciendo una mayor tasa de absorción de nutrientes.



## CAPITULO VI

### CONCLUSIONES



## Conclusiones

1. En la presente tesis biosintetizamos Se<sup>0</sup>Nps en las bacterias *Pantoea agglomerans* UC-32 y *Lactiplantibacillus plantarum* S14 y evaluamos sus potencialidades biotecnológicas como suplemento nutricional de acuerdo con sus efectos sobre el estado oxidativo, el desempeño inmunológico y parámetros productivos en la trucha arcoíris.
2. El uso de la L-Cys como agente funcionalizante de Se<sup>0</sup>Nps biosintetizadas por *P. agglomerans* UC-32 determinó tamaños significativamente menores de Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys que los observados en las Se<sup>0</sup>Nps no funcionalizadas.
3. Las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys fueron significativamente menos tóxicas que el Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> para las líneas celulares RTgill-W1 y RTS11 y el cultivo primario T-PHKM de trucha arcoíris. La toxicidad de las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys y del Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> fue dosis dependiente, siendo en ambas fuentes de Se, menor para 160 nM y mayor para los 640 nM.
4. Las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys mostraron proveer la mayor protección antioxidante en las líneas celulares RTgill-W1 y RTS11 y el cultivo primario T-PHKM de trucha arcoíris a las que les fue inducido EO mediante co-cultivo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 h. El co-cultivo de RTgill-W1, RTS11 o T-PHKM con 640 nM de Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys determinó la mayor protección antioxidante en los tres tipos celulares sometidos a EO, reduciendo con mayor eficacia la concentración de ROS intracelular e incrementando la viabilidad celular.
5. La suplementación dietaria con 5 mg Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys kg<sup>-1</sup> materia seca de alimento, administrada por 30 días, fue más eficaz que 5 mg Se<sup>0</sup>Nps o Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> kg<sup>-1</sup> materia seca de alimento mejorando los índices de los marcadores de evaluación de la respuesta inmune innata; la actividad de la lisozima plasmática y la actividad del estallido respiratorio en leucocitos de circulación periférica.
6. La suplementación dietaria con 5 mg Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys kg<sup>-1</sup> materia seca de alimento, administrada por 30 días, fue más eficaz que 5 mg Se<sup>0</sup>Nps kg<sup>-1</sup>, 5 mg Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> kg<sup>-1</sup> materia seca de alimento y el grupo control incrementando la actividad de la enzima antioxidante Gpx en plasma, hígado y músculo dorsal.

7. La suplementación dietaria con 5 mg Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys kg<sup>-1</sup> materia seca de alimento, administrada por 30 días, fue más eficaz que 5 mg Se<sup>0</sup>Nps kg<sup>-1</sup>, 5 mg Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> kg<sup>-1</sup> materia seca de alimento y el grupo control, incrementando tasas de crecimiento en todos los índices evaluados, siendo significativa la diferencia en el factor de condición final (FCF), implicando que las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys favorecerían mayormente el depósito de reservas energéticas en los tejidos y el bienestar de los peces.
8. *Lactiplantibacillus plantarum* S14 aislado desde el contenido intestinal de trucha arcoíris mostró potencialidad probiótica y fue capaz de biosintetizar Se<sup>0</sup>Nps que, mediante TEM mostraron tener diámetros de 98 a 245 nm. Mediante TEM y SEM se observó que las Se<sup>0</sup>Nps se mantuvieron adheridas a la superficie externa de la pared celular y a través de SEM-EDS se comprobó que las Se<sup>0</sup>Nps se constituyeron de Se.
9. La suplementación dietaria con 10<sup>8</sup> CFU LABS14-Se<sup>0</sup>Nps g<sup>-1</sup> de materia seca de alimento fue más eficaz que 10<sup>8</sup> CFU LABS14 g<sup>-1</sup> de materia seca de alimento y el grupo control mejorando los índices de los marcadores de evaluación de la respuesta inmune innata, la actividad de la lisozima plasmática y la actividad del estallido respiratorio en leucocitos de circulación periférica.
10. La suplementación dietaria con 10<sup>8</sup> CFU LABS14-Se<sup>0</sup>Nps g<sup>-1</sup> de materia seca de alimento, administrada por 30 días, tuvo el mejor desempeño incrementando la actividad de la enzima antioxidante Gpx en plasma, hígado y músculo dorsal de trucha arcoíris.
11. La suplementación dietaria con 10<sup>8</sup> CFU LABS14-Se<sup>0</sup>Nps por g de materia seca de alimento, administrada por 30 días, fue más eficaz que 10<sup>8</sup> CFU LABS14 g<sup>-1</sup> de materia seca de alimento y el grupo control incrementando todos los índices evaluados, especialmente en FCF en donde LABS14-Se<sup>0</sup>Nps fue significativamente más eficaz.
12. Tanto las Se<sup>0</sup>Nps/L-Cys como LABS14-Se<sup>0</sup>Nps incluidas en la dieta como suplemento nutricional, resultaron ser más eficaces incrementando todos los parámetros incluidos en este estudio, por lo que se aceptan las hipótesis planteadas.

## CAPÍTULO VII

### REFERENCIAS





## Referencias

1. Boland, M.J.; Rae, A.N.; Vereijken, J.M, Meuwissen, M.P.M.; Fischer, A.R.H.; .van Boekel, M.A.J.S.; Rutherford, S.M.; Gruppen, H.; Moughan, P.J.; Hendriks, W.H. The future supply of animal-derived protein for human consumption. *Trends Food Sci Technol.* **2013**; 29, 62- 73.
2. PCC. IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate. **2019**. In: H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, V. Masson-Delmotte, P. Zhai, M. Tignor, E. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Nicolai, A. Okem, J. Petzold, B. Rama, N.M. Weyer (eds.). In press.
3. IPCC. Summary for policymakers. In: Masson-Delmotte V *et al.* (eds). Climate change and land. An IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems. **2019**. World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland.
4. Shepherd, C.J.; Jackson, A. Global fishmeal and fish oil supply–inputs, outputs and markets. *J Fish Biol.* **2013**; 83(4), 1046- 1066.
5. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in Action. Italy: *Food and Agriculture Organization of the United Nations.* **2020**, 244.
6. Bush, S.R.; Pauwelussen, A.; Badia, P.; Kruk, S.; Little, D.; Luong, L.T.; Newton, Nhan, D.T.; Rahman, M.M.; Sorgeloos, P.; Sun, Y.Y. Implementing aquaculture technology and innovation platforms in Asia. *Aquaculture* **2021**, 530, 735822.
7. Iversen, A.; Asche, F.; Hermansen, Ø.; Nystøyl, R. Production cost and competitiveness in major salmon farming countries 2003–2018. *Aquaculture* **2020**, 522, 735089.
8. Asche, F.; Bjørndal, T. *The Economics of Salmon Aquaculture* (Second edition), Wiley-Blackwell. 2011. ISBN 978-0-85238-2899. Reino Unido.
9. Hosono, A. Genesis of Chilean Salmon Farming. Chapter 2. In: Hosono, A.; Iizuka, M.; Katz, J. (eds). *Chile's Salmon Industry: Industry: Policy Challenges in Managing Public Goods*, pp. 21– 44. Springer, Japan.
10. Consejo del Salmón Chile. Informe trimestral de Exportaciones de salmón. Primer trimestre de 2022. 8 de abril de 2022. Disponible en: <https://www.consejodelsalmon.cl/wp-content/uploads/2022/04/080422-Reporte-exportaciones-salmon-I-trim-22-vf.pdf>.

11. Droshnev, A.E.; Bulina, K.Y.; Alontseva, D.A.; Belimenko, V.V.; Zavyalova, E.A. Microbiological monitoring of causative agents of infectious diseases of salmon in the Northwest region. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* **2019**, 315 072007.
12. Ceballos, A.; Dresdner-Cid, J.D.; Quiroga-Suazo, M.A. Does the location of salmon farms contribute to the reduction of poverty in remote coastal areas? An impact assessment using a Chilean case study. *Food Policy* **2018**, 75, 68–79.
13. Lozano-Muñoz, I.; Wacyk, J.; Kretschmer, C.; Vásquez-Martínez, Y.; Cortez-SanMartín, M. Antimicrobial resistance in Chilean marine-farmed salmon: Improving food safety through One Health. *One Health* **2021**, 12, 100219.
14. Miranda, C.D.; Godoy, F.A.; Lee, M.R. Current Status of the Use of Antibiotics and the Antimicrobial Resistance in the Chilean Salmon Farms. *Front. Microbiol.* **2018**, 9, 1284.
15. Watts, J.E.; Schreier, H.J.; Lanska, L.; Hale, M.S. The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: sources, sinks and solutions. *Mar. Drugs*. **2017**, 15, 158.
16. Hornick, K.M.; Buschmann, A.H. Insights into the diversity and metabolic function of bacterial communities in sediments from Chilean salmon aquaculture. *Ann Microbiol.* **2018**, 68, 63-77
17. Higuera-Llantén, S.; Vásquez-Ponce, F.; Barrientos-Espinoza, B.; Mardones, F.O.; Marshall, S.H.; Olivares-Pacheco, J. Extended antibiotic treatment in salmon farms select multiresistant gut bacteria with a high prevalence of antibiotic resistance genes. *PLoS One* **2018**, 13, e0203641.
18. Avendaño-Herrera, R.; Irgang, R.; Sandoval, C.; Moreno-Lira, P.; Houel, A.; Duchaud, E.; Poblete-Morales, M.; Nicolas, P.; Ilardi, P. Isolation, Characterization and Virulence Potential of *Tenacibaculum dicentrarchi* in Salmonid Cultures in Chile. *Transboundary and Emerging Diseases* **2016**, 63, 121–126.
19. Valdes, S.; Irgang, R.; Barros, M.C.; Ilardi, P.; Saldariaga-Córdoba, M.; Rivera-Bohle, J.; Madrid, E.; Gajardo-Córdova, J.; Avendaño-Herrera, R. First report and characterization of *Tenacibaculum maritimum* isolates recovered from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farmed in Chile. *J Fish Dis.* **2021**, 00, 1–10.
20. Bandara, T. Alternative feed ingredients in aquaculture: Opportunities and challenges. *Journal of Entomology and Zoology Studies* **2018**, 6(2), 3087-3094.
21. Ytrestøyl, T.; Aas, T.S.; Åsgård, T. Utilization of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **2015**, 448, 365–374.

22. Intrafish. Demand for alternative feed ingredients rises as inflation, food security play bigger part in purchasing decisions. **2022**. <https://www.intrafish.com/aquaculture/demand-for-alternative-feed-ingredients-rises-as-inflation-food-security-play-bigger-part-in-purchasing-decisions/2-1-1267446>. Acceso 25 julio de 2022.
23. Makkar, H.P.S. *Antinutritional factors in foods for livestock*, En: Animal Production in Developing Countries, British Society of Animal Production. **1993**, 69-85.
24. Francis, G.; Makkar, H.P.S.; Becker, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* **2001**, 199(3-4),197-227.
25. Johnson IT, Gee JM, Price K, Curl C, Fenwick GR. Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport in vitro. *Journal of Nutrition* **1986**, 116(11), 2270-7.
26. Jackson AJ, Capper BS, Matty AJ. Evaluation of some plant proteins in complete diets for the tilapia *Sarotherodon mossambicus*. *Aquaculture* **1982**, 27(2), 97-109.
27. Richardson, N.L.; Higgs, D.A.; Beames, R.M.; McBride, J.R. Influence of dietary calcium, phosphorus, zinc and sodium phytate level on cataract incidence, growth and histopathology in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Nutrition* **1985**, 115(5), 553-67.
28. Lall, S.; Kaushik, S. Nutrition and Metabolism of Minerals in Fish. *Animals* **2021**, 11, 2711.
29. Hilton, J.W.; Hodson, P.V.; Slinger, S.J. The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Nutr.* **1980**, 110, 2527–2535
30. Du, L.C.; Yu, H.R.; Li, L.Y.; Zhang, Q.; Tian, Q.; Liu, J.Q.; Shan, L.L. Dietary selenium requirement of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* W.) alevins. *Aquac. Int.* **2021**, 29, 2291–2304.
31. Antony Jesu Prabhu, P.; Holen, E.; Espe, M.; Silva, M.S.; Holme, M.H.; Hamre, K.; Lock, E.; Waagbø, R. Dietary selenium required to achieve body homeostasis and attenuate pro-inflammatory responses in Atlantic salmon post-smolt exceeds the present EU legal limit. *Aquaculture* **2020**, 526, 735413.
32. Pérez-Valenzuela, J.; Mejías, M.; Ortiz, D.; Salgado, P.; Montt, L.; Chávez-Báez, I.; Vera-Tamargo, F.; Mandakovic, D.; Wacyk, J.; Pulgar, R. Increased dietary availability of selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) improves its plasma antioxidant

- capacity and resistance to infection with *Piscirickettsia salmonis*. *Veterinary Research* **2021**, 52, 64.
33. Antony Jesu Prabhu, P.; Schrama, J.W.; Kaushik, S.J. Mineral requirements of fish: A systematic review. *Rev. Aquac.* **2016**, 8, 172–219.
34. Kaufmann, S.H.E.; Dorhoi, A.; Hotchkiss, R.S.; Bartenschlager, R. Hostdirected therapies for bacterial and viral infections. *Nat Publ Gr.* **2018**, 17, 35–56.
35. Dar, A.H.; Rashid, N.; Majid, I.; Hussain, S.; Dar, M.A. Nanotechnology interventions in aquaculture and seafood preservation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2020**, 60(11), 1912-1921.
36. Desai, M.P.; Labhasetwar, V.; Walter, E.; Levy, R.J.; Amidon, G.L. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm. Res.* **1997**, 14, 1568–1573.
37. Fratoddi, I. Hydrophobic and Hydrophilic Au and Ag Nanoparticles. Breakthroughs and Perspectives. *Nanomaterials* **2017**, 8, 11.
38. Ramanathan, A. Toxicity of nanoparticles\_ challenges and opportunities. *Appl. Microsc.* **2019**, 49, 2.
39. Maharramov, A.M.; Hasanova, U.A.; Suleymanova, I.A.; Osmanova, G.E.; Hajiyeva, N.E. The engineered nanoparticles in food chain: Potential toxicity and effects. *SN Appl. Sci.* **2019**, 1, 1362.
40. Khan, F.H. Chemical hazards of nanoparticles to human and environment (a review). *Orient. J. Chem.* **2013**, 29, 1399.
41. Buchman, J.T.; Hudson-Smith, N.V.; Landy, K.M.; Haynes, C.L. Understanding Nanoparticle Toxicity Mechanisms To Inform Redesign Strategies To Reduce Environmental Impact. *Acc. Chem. Res.* **2019**, 52, 1632–1642.
42. Sharma, D.; Kanchi, S.; Bisetty, K. Biogenic synthesis of nanoparticles: A review. *Arab. J. Chem.* **2019**, 12, 3576–3600.
43. Shi, L.; Xun, W.; Yue, W.; Zhang, C.; Ren, Y.; Qiang, L.; Wang, Q.; Shi, L. Effect of elemental nano-selenium on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep. *Fuel Energy Abstr.* **2011**, 163, 136–142.
44. Kojouri, G.; Arbabi, F.; Mohebhi, A. The effects of selenium nanoparticles (SeNPs) on oxidant and antioxidant activities and neonatal lamb weight gain pattern. *Comp. Clin. Pathol.* **2020**, 29, 369–374.

45. Cai, S.J.; Wu, C.X.; Gong, L.M.; Song, T.; Wu, H.; Zhang, L.Y. Effects of nano-selenium on performance, meat quality, immune function, oxidation resistance, and tissue selenium content in broilers. *Poult. Sci.* **2012**, *91*, 2532–2539.
46. Ahmadi, M.; Ahmadian, A.; Seidavi, A. Effect of Different Levels of Nano-selenium on Performance, Blood Parameters, Immunity and Carcass Characteristics of Broiler Chickens. *Poult. Sci. J.* **2018**, *6*, 99–108.
47. Zhou, X.; Wang, Y.; Gu, Q.; Li, W. Effect of different dietary selenium source (selenium nanoparticle and selenomethionine) on growth performance, muscle composition and glutathione peroxidase enzyme activity of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Aquaculture* **2009**, *291*, 78–81.
48. Kohshahi, A.J.; Sourinejad, I.; Sarkheil, M.; Johari, S.A. Dietary cosupplementation with curcumin and different selenium sources (nanoparticulate, organic, and inorganic selenium): Influence on growth performance, body composition, immune responses, and glutathione peroxidase activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* **2019**, *45*, 793–804.
49. Løkka, G.; Koppang, E.O. Antigen sampling in the fish intestine. *Dev. Comp. Immunol.* **2016**, *64*, 138-149.
50. Gajardo, K.; Jaramillo-Torres, A.; Kortner, T.M.; Merrifield, D.L.; Tinsley, J.; Bakke, A.M.; Krogdahl, Å. Alternative Protein Sources in the Diet Modulate Microbiota and Functionality in the Distal Intestine of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, *83*(5), e02615-16.
51. Dehler, C.E.; Secombes, C.J.; Martin, S.A.M. Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.) *Aquaculture* **2017**, *467*, 149-157.
52. Schmidt, V.; Amaral-Zettler, L.; Davidson, J.; Summerfelt, S.; Good, C. Influence of Fishmeal-Free Diets on Microbial Communities in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Recirculation Aquaculture Systems. *Appl Environ Microbiol.* **2016**, *82*, 4470–4481.
53. Webster, T.M.; Consuegra, S.; Hitchings, M.; García de Leaniz, C. Interpopulation Variation in the Atlantic Salmon Microbiome Reflects Environmental and Genetic Diversity. *Appl Environ Microbiol.* **2018**, *15*, 84(16), e00691-18.
54. He, X.; Chaganti, S.R.; Heath, D.D. Population-Specific Responses to Interspecific Competition in the Gut Microbiota of Two Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Populations. *Microbial Ecology* **2018**, *75*, 140–151.

55. Kraimi, N.; Dawkins, M.; Gebhardt-Henrich, S.G.; Velge, P.; Rychlik, I.; Volf, J.; Creach, P.; Smith, A.; Colles, F.; Leterrier, C. Influence of the microbiota-gut-brain axis on behavior and welfare in farm animals: A review. *Physiology & Behavior* **2019**, 210, 112658.
56. Segner, H.; Reiser, S.; Ruane, N.; Rösch, R.; Steinhagen, D.; Vehanen, T. Welfare of fishes in aquaculture. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1189*. Budapest, FAO **2019**.
57. Bjørgen, H.; Li, Y.; Kortner, T.M.; Krogdahl, Å.; Koppang, E.O. Anatomy, immunology, digestive physiology and microbiota of the salmonid intestine: Knowns and unknowns under the impact of an expanding industrialized production. *Fish & Shellfish Immunology* **2020**, 107, 172-186.
58. De Santa Barbara, P.; Van Den Brink, G.R.; Roberts, D.J. Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, 60(7), 1322-1332.
59. Wallace, K.N.; Akhter, S.; Smith, E.M.; Lorent, K.; Pack, M. Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mechanisms of Development* **2005**, 122(2), 157-173.
60. Ng, A.N.; de Jong-Curtain, T.A.; Mawdsley, D.; White, S.; Shin, J.; Appel, B.; Dong, P.; Stainier, D.; Heath, J.K. Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. *Developmental Biology* **2005**, 286(1), 114-135.
61. Løkka, G.; Austbø, L.; Falk, K.; Bjerkås, I.; Koppang, E.O. Intestinal morphology of the wild atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Morphology* **2013**, 274(8), 859-876.
62. Koppang, E.O.; Press, C.M.; Rønningen, K.; Lie, Ø. Expression of Mhc class I mRNA in tissues from vaccinated and non-vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology* **1998**, 8(8), 577-587.
63. Koppang, E.O.; Lundin, M.; Press, C.; Rønningen, K.; Lie, Ø. Differing levels of Mhc class II  $\beta$  chain expression in a range of tissues from vaccinated and non-vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology* **1998**, 8(3), 183-196.
64. Harstad, H.; Lukacs, M.F.; Bakke, H.G.; Grimholt, U. Multiple expressed MHC class II loci in salmonids; details of one non-classical region in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* **2008**, 9, 193.
65. Løkka, G.; Austbø, L.; Falk, K.; Bromage, E.; Fjellidal, P.G.; Hansen, T.; Hordvik, I.; Koppang, E.O. Immune parameters in the intestine of wild and reared unvaccinated and vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Developmental & Comparative Immunology* **2014**, 47(1), 6-16.

66. vanden Ingh, T.S.G.; Kroghdahl, Å.; Olli, J.J.; Hendricks H.G.C.; Koninkx, J.G.J. Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a morphological study. *Aquaculture* **1991** 94(4), 297-305.
67. Bjørgen, H.; Hellberg, H.; Løken, O.M.; Gunnes, G.; Koppang, E.O.; Dale, O.B. Tumor microenvironment and stroma in intestinal adenocarcinomas and associated metastases in Atlantic salmon broodfish (*Salmo salar*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* **2019**, 214, 109891.
68. Fuglem, B.; Jirillo, E.; Bjerås, I.; Kiyono, H.; Nochi, T.; Yuki, Y.; Raida, M.; Fischer, U.; Koppang, E.O. Antigen-sampling cells in the salmonid intestinal epithelium. *Developmental & Comparative Immunology* **2010**, 34(7), 768-774.
69. Frey, A.; Giannasca, K.T.; Weltzin, R.; Giannasca, P.J.; Reggio, H.; Lencer, W.I.; Neutra, M.R. Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *The Journal of Experimental Medicine* **1996**, 184(3), 1045-1059.
70. Jin, C.; Padra, J.T.; Sundell, K.; Sundh, H.; Karlsson, N.G.; Lindén, S.K. Atlantic Salmon Carries a Range of Novel O-Glycan Structures Differentially Localized on Skin and Intestinal Mucins. *J. Proteome Res.* **2015**, 14(8), 3239–3251.
71. Powell, M.; Speare, D.J.; Wright, G.M. Comparative ultrastructural morphology of lamellar epithelial, chloride and mucous cell glycocalyx of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill. *J. Fish. Biol.* 1994, 44(4), 725-730.
72. Salinas, I.; Parra, D. *Fish mucosal immunity: intestine*. En: *Mucosal Health in Aquaculture*, Elsevier. **2015**, pp. 135-170.
73. Gomez, D.; Sunyer, J.O.; Salinas, I. The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish Shellfish Immunol.* **2013**, 35(6), 1729-1739.
74. Xu, Z.; Takizawa, F.; Casadei, E.; Shibasaki, Y.; Ding, Y.; Sauters, T.J.; Yu, Y.; Salinas, I.; Sunyer, J.O. Specialization of mucosal immunoglobulins in pathogen control and microbiota homeostasis occurred early in vertebrate evolution. *Science Immunology* **2020**, 5(44), doi: 10.1126/sciimmunol.aay3254.
75. Ayabe, T.; Ashida, T.; Kohgo, Y.; Komo, T. The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends in Microbiology* **2004**, 12(8), 394-398.

76. Hellberg, H.; Bjerkas, I. The anatomy of the oesophagus, stomach and intestine in common wolffish (*Anarhichas lupus* L.): a basis for diagnostic work and research. *Acta Vet. Scand.* **2000**, 41(3), 283-298.
77. Koppang, E.O.; Thomas, G.A.; Rønningen, K.; Press, C.M. Expression of insulin-like growth factor-I in the gastrointestinal tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* **1998**, 18, 167-175.
78. Harte, A.; Tian, G.; Xu, Q.; Secombes, C.J.; Wang, T. Five subfamilies of  $\beta$ -defensin genes are present in salmonids: Evolutionary insights and expression analysis in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Developmental & Comparative Immunology* **2020**, 104, 103560.
79. Jeurissen, S.H.; David, S.; Sminia, T. Uptake of particulate and soluble antigen in the small intestines of the rat. *Cell Biol. Int. Rep.* **1985**, 9, 523.
80. Menard, S.; Cerf-Bensussan, N.; Heyman, M. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol.* **2010**, 3, 247e259.
81. Holmgren, J.; Czerkinsky, C. Mucosal Immunity and vaccines. *Nat. Med.* **2005**, 11, S45-S53.
82. Hershberg, R.M.; Mayer, L.F. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol. Today* **2000**, 21, 123e128.
83. Neumann, N.F.; Stafford, J.L.; Barreda, D.; Ainsworth, A.J.; Belosevic, M. Antimicrobial mechanism of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev. Comp. Immunol.* **2001**, 25, 807-825.
84. Ringø, E.; Olsen, R.E.; Vecine, J.L.G.; Wadsworth, S.; Song, S.K. Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a review. *J. Mar. Sci. Res. Dev.* **2011**, 1. <http://dx.doi.org/10.4172./2155-9910.10000104>.
85. McLean, E.; Rønsholdt, B.; Sten, C.; Najamuddin. Gastrointestinal delivery of peptide and protein drugs to aquacultured teleosts. *Aquaculture* **1999**, 177, 231e247.
86. Winkelbach, A.; Günzel, D.; Schulz, C.; Wuertz, S. Differences in IgY gut absorption in gastric rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and agastric common carp (*Cyprinus carpio*) assessed in vivo and in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **2015**, 167, 58-64.
87. Azad, I.S.; Shankar, K.M.; Mohan, C.V.; Kalita, B. Uptake and processing of biofilm and free-cell vaccines of *Aeromonas hydrophila* in Indian major carps and common carp following oral vaccination-antigen localization by a monoclonal antibody. *Diseases of Aquatic Organisms* **2000**, 43, 103-108.



88. Davina, J.H.M.; Parmentier, H.K.; Timmermans, L.P.M. Effect of oral vaccination of *Vibrio* bacterin on the intestine of cyprinid fish. *Dev. Comp. Immunol.* **1982**, 2, 157e166.
89. Joosten, P.H.M.; Kruijer, W.J.; Rombout, J.H.W.M. Anal immunisation of carp and rainbow trout with different fractions of a *Vibrio anguillarum* bacterin. *Fish. Shellfish Immunol.* **1996**, 6, 541-551.
90. Joosten, P.H.M.; Tiemersma, E.; Threels, A.; Caumartin-Dhieux, C.; Rombout, J.H.W.M. Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles. *Fish. Shellfish Immunol.* **1997**, 7, 471e485.
91. Khimmakthong, U.; Deshmukh, S.; Chettri, J.K.; Bojesen, A.M.; Kania, P.W.; Dalsgaard, I.; Buchmann, K. Tissue specific uptake of inactivated and live *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): visualization by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Microb. Pathog.* **2013**, 5960, 33e41.
92. Ohtani, M.; Villumsen, K.R.; Koppang, E.O.; Raida, M.K. Global 3D imaging of *Yersinia ruckeri* bacterin uptake in rainbow Trout fry. *PLoS One* **2015**, 10 e0117263.
93. Grisez, L., Chair, M., Sorgeloos, P., Ollevier, F. Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. *Diseases of Aquatic Organisms* **1996**, 26, 181e187.
94. Hansen, G.H.; Strom, E.; Olafsen, J.A. Effect of different holding regimens on the intestinal microflora of herring (*Clupea harengus*) larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, 58, 461-470.
95. Olafsen, J.A.; Hansen, G.H. Intact antigen uptake in intestinal epithelial cells of marine fish larvae. *J. Fish. Biol.* **1992**, 40, 141e156.
96. Howe, S.E.; Lickteig, D.J.; Plunkett, K.N.; Ryerse, J.S.; Konjufca, V. The uptake of soluble and particulate antigens by epithelial cells in the mouse small intestine. *PLoS One* **2014**, 9, e86656
97. Bockman, D.E.; Boydston, W.R.; Beezhold, D.H. The role of epithelial cells in gut-associated immune reactivity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1983**, 409, 129e144.
98. Neutra, M.R.; Mantis, N.J.; Kraehenbuhl, J.P. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissue. *Nat. Immunol.* **2001**, 2, 1004-1009.
99. Goto, Y.; Ivanov, I.I. Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal-host immune crosstalk. *Immunol. Cell Biol.* **2013**, 91, 204-214.
100. Romarheim, O.H.; Hetland, D.L.; Skrede, A.; Øverland, M.; Mydland, L.T.; Landsverk, T. Prevention of soya-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by bacteria grown

- on natural gas is dose dependent and related to epithelial MHC II reactivity and CD8 $\alpha$  intraepithelial lymphocytes. *Br. J. Nutr.* **2013**, 109, 1062e1070.
101. Rombout, J.H.W.M.; Lamers, C.H.; Helfrich, M.H.; Dekker, A.; Taverne-Thiele, J.J. Uptake and transport of intact macromolecules in the intestinal epithelium of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the possible immunological implications. *Cell Tissue Res.* **1985**, 239, 519e530.
  102. Rombout, J.H.W.M.; van den Berg, A.A. Immunological importance of the second gut segment of carp. I. Uptake and processing of antigens by epithelial cells and macrophages. *Journal of Fish Biology* **1989**, 35(1), 13-22.
  103. Stroband, H.W.J.F.H.; van der Veen, F.H. Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of the grasscarp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Journal of Experimental Zoology* **1981**, 218(2), 149-156.
  104. Amthauer, R.; Tobar, L.; Molina, H.; Concha, M.; Villanueva, J. Horseradish peroxidase binding to intestinal brush-border membranes of *Cyprinus carpio*. Identification of a putative receptor. *J. Cell. Biochem.* **2001**, 80, 274-284.
  105. Companjen, A.R.; Florack, D.E.A.; Slootweg, T.; Borst, J.W.; Rombout, J.H.W.M. Improved uptake of plant-derived LTB-linked proteins in carp gut and induction of specific humoral immune responses upon infeed delivery. *Fish & Shellfish Immunology* **2006**, 21(3), 251-260.
  106. Urán, P.A.; Aydin, R.; Schrama, J.W.; Verreth, J.A.J.; Rombout, J.H.W.M. Soybean meal-induced uptake block in Atlantic salmon *Salmo salar* distal enterocytes. *Journal of Fish Biology* **2008**, 73(10), 2571-2579.
  107. Georgopoulou, U.; Sire, M.F.; Vernier, J.M. Macromolecular absorption of proteins by epithelial cells of the posterior intestinal segment and their intracellular digestion in the rainbow trout. Ultrastructural and biochemical study. *Biol. Cell.* **1985**, 53, 269-282.
  108. Georgopoulou, U.; Dabrowski, K.; Sire, M.F.; Vernier, J.M. Absorption of intact proteins by the intestinal epithelium of trout, *Salmo gairdneri*. A luminescence enzyme immunoassay and cytochemical study. *Cell Tissue Res.* **1988**, 251, 145e152.
  109. Noaillac-Depeyre, J.; Gas, N. Electron microscopic study on gut epithelium of the tench (*Tinca tinca* L.) with respect to its absorptive functions. *Tissue and Cell* 1976, 8(3), 511-530.
  110. Rombout, J.H.; Yang, G.; Kiron, V. Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* **2014**, 40(2), 634-643.

111. Smith, P.D.; MacDonald, T.T.; Blumberg, R.R.S. *Immune Function of Epithelial Cells*. En: Principals of Mucosal Immunology, first ed. Garland Science, New York, **2013**, pp. 55-68.
112. Krogdahl, A.; Sundby, A.; Holm, H. Characteristics of digestive processes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Enzyme pH optima, chyme pH, and enzyme activities *Aquaculture* **2015**, 449, 27-36.
113. Krogdahl, A.; Sundby, A. Characteristics of pancreatic function in fish. *Biology of the Pancreas in Growing Animals* **1999**, 28, 437-458.
114. Krogdahl, Å.; Sundby, A.; Olli, J.J. Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) digest and metabolize nutrients differently. Effects of water salinity and dietary starch level. *Aquaculture* **2004**, 229 (1–4), 335-360.
115. Frøystad, M.K.; Lilleeng, E.; Sundby, A.; Krogdahl, Å. Cloning and characterization of  $\alpha$ -amylase from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **2006**, 145(4), 479-492.
116. Aas, T.S.; Ytrestoyl, T.; Asgard, T. Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: an update for 2016. *Aquaculture Reports* **2019**, 15.
117. Kortner, T.M.; Björkhem, I.; Krasnov, A.; Timmerhaus, G.; Krogdahl, Å. Dietary cholesterol supplementation to a plant-based diet suppresses the complete pathway of cholesterol synthesis and induces bile acid production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition* **2014**, 111, 2089-2103.
118. Romarheim, O.H.; Skrede, A.; Gao, Y.; Krogdahl, Å.; Denstadli, V.; Lilleeng, E.; Storebakken, T. Comparison of white flakes and toasted soybean meal partly replacing fish meal as protein source in extruded feed for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **2006**, 256(1–4), 354-364.
119. Romarheim, O.H.; Skrede, A.; Penn M.; Mydland, T.L.; Krogdahl, Å.; Storebakken, T. Lipid digestibility, bile drainage and development of morphological intestinal changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing defatted soybean meal. *Aquaculture* **2008**, 274(2-4), 329-338.
120. Kortner, T.M.; Gu, J.; Krogdahl, Å.; Bakke, A.M. Transcriptional regulation of cholesterol and bile acid metabolism after dietary soyabean meal treatment in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition* **2013**, 109, 593-604.

121. Gu, M.; Kortner, T.M.; Penn, M.; Hansen, A.K.; Krogdahl, Å. Effects of dietary plant meal and soya-saponin supplementation on intestinal and hepatic lipid droplet accumulation and lipoprotein and sterol metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition* **2014**, 111, 432-444.
122. Kortner, T.M.; Penn, M.H.; Björkhem, I.; Måsøval, K.; Krogdahl, Å. Bile components and lecithin supplemented to plant-based diets do not diminish diet related intestinal inflammation in Atlantic salmon. *BMC Veterinary Research* **2016**, 12,190.
123. Green, G.M.; Nasset, E.S. Importance of bile in regulation of intraluminal proteolytic enzyme activities in the rat. *Gastroenterology* **1980**, 79, 695-702.
124. Bakke, A.M.; Glover, C.; Krogdahl, Å. *Feeding, digestion and absorption of nutrients*. En: M. Grosell, A.P. Farrell, C.J. Brauner (Eds.), *The Multifunctional Gut of Fish*. **2011**.
125. Bakke-McKellep, A.M.; Nordrum, S.; Krogdahl, Å.; Buddington, R.K. Absorption of glucose, amino acids, and dipeptides by the intestines of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* **2000**, 22, 33-44.
126. Denstadli, V.; Vegusdal, A.; Krogdahl, Å.; Bakke-McKellep, A.M.; Berge, G.M.; Holm, H.; Hillestad, M.; Ruyter, B. Lipid absorption in different segments of the gastrointestinal tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* **2004**, 240(1–4), 385-398.
127. Suttle, N. *Mineral Nutrition of Livestock*, 4th ed.; Commonwealth Agricultural Bureaux International: Oxfordshire, UK, **2010**; p. 579.
128. Lall, S.P. *The minerals*. En: *Fish Nutrition*, 3rd ed.; Halver, J.E., Hardy, R.W., Eds.; Elsevier/Academic Press: San Diego, CA, USA, **2002**; pp. 259–308.
129. National Research Council. *Nutrient Requirements of Fish*; The National Academies Press: Washington, DC, USA, **1993**.
130. National Research Council. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*; The National Academies Press: Washington, DC, USA, **2011**.
131. Evans, D.H.; Claiborne, J.B. *Osmotic and ionic regulation in fishes*. En: *Osmotic and Ionic regulation: Cells and Animals*; Evans, D.H., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, **2009**, pp. 295–366.
132. O'Dell, B.L. *Mineral-ion interaction as assessed by bioavailability and ion-channel function*. En: *Handbook of Nutritionally Essential Elements*. O'Dell, B.L.; Sunde, R.A.; Eds.; Marcel Dekker Inc. New York, NY, USA, **1997**, pp. 641–659.
133. Erdman, J.W. Oilseeds phytates: Nutritional implications. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1979**, 66, 736–741.

134. Hilton, J.W. The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. *Aquaculture* **1989**, 79, 223–244.
135. Ammerman, C.B. *Methods for estimation of mineral bioavailability*. En: Bioavailability of Nutrients for Animals: Amino Acids, Minerals and Vitamins. Ammerman, C.B.; Baker, D.J.; Lewis, A.J. Eds.; Elsevier/Academic Press: San Diego, CA, USA, **1995**, pp. 83–94.
136. Bury, N.R.; Walker, P.A. Glover, C.N. Nutritive metal uptake in teleost fish. *J. Exp. Biol.* **2003**, 206, 11–23.
137. Wood, C.M. *An introduction to metals in fish physiology and toxicology: Basic principles*. En: Fish physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals; Wood, C.M.; Farrell, A.M.; Brauner, C.J.; Eds.; Elsevier/Academic Press: Cambridge, MA, USA, **2012**, pp. 1–53.
138. Brix, K.V.; Tellis, M.S.; Crémazy, A.; Wood, C.M. Characterization of the effects of binary metal mixtures on short-term uptake of Cd, Pb, and Zn by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* **2017**, 193, 217–227.
139. Janz, D.M. *Selenium*. En: *Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*; Wood, C.M., Farrell, A.M., Brauner, C.J., Eds.; Elsevier/Academic Press: Cambridge, MA, USA, **2012**, pp. 329–374.
140. Janz, D.M.; DeForest, D.K.; Brooks, M.L.; Chapman, P.M.; Gilron, G.; Hoff, D.J.; Hoppkins, W.A.; McIntyre, D.O.; Mebane, C.A.; Palace, V.P. *Selenium Toxicity to Aquatic Organisms*. En: Ecological Assessment of Selenium in the Aquatic Environment; Chapman, P.M.; Adams, W.J.; Brooks, M.L.; Delos, C.G.; Luoma, S.N.; Maher, W.A.; Ohlendorf, H.M.; Presser, T.S.; Shaw, D.P. Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, **2019**, pp. 141–231.
141. Burriel, F.; Lucena, F.; Arribas, J.; Hernández, J. 1994. Química Analítica Cualitativa. 15<sup>ta</sup> edición. España. 567-572.
142. Ruiz, M.P. Bioacumulación de distintas especies de selenio y sus efectos en organismos marinos. Tesis Doctoral, Universidad de Huelva, **2017**. Disponible en: <http://rabida.uhu.es/dspace/handle/10272/15083>. Acceso, 10 agosto 2022.
143. Chumpitaz, C.C. El selenio, un elemento poco conocido con un rol biológico importante. *Rev Química* **2011**, 25(1–2), 29–33.
144. Yang, R.; Liu, Y.; Zhou, Z. Selenium and Selenoproteins, from Structure, Function to Food Resource and Nutrition. *Food Sci Technol Res* **2017**, 23(3), 363–73.

145. Mehdi, Y.; Hornick, J.-L.; Istasse, L.; Dufrasne, I. Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. *Molecules* **2013**, 18(3), 3292–311.
146. Lyons, M.P.; Papazya, T.T.; Surai, P.F. Selenium in Food Chain and Animal Nutrition: Lessons from Nature -Review-. *Asian-Australasian J Anim Sci* **2007**, 20(7), 1135–55.
147. Giovanneti, V.J. Calidad fisicoquímica del agua potable en la región Metropolitana, Chile. Memoria para optar al título de Geóloga. Universidad de Chile **2018**.
148. Wright, J. The chemistry of the atmosphere. En: Environmental Chemistry, 1ra edición. Wright, J. Ed, London, **2003**, pp. 26.
149. Poston, H.A.; Combs, G.F.; Leibovitz, L. Vitamin E and selenium interrelations in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*): Gross, histological and biochemical deficiency signs. *J. Nutr.* **1976**, 106, 892–904.
150. Hilton, J.W.; Hodson, P.V.; Slinger, S.J. The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Nutr.* **1980**, 110, 2527–2535.
151. Hodson, P.V.; Hilton, J.W. The nutritional requirements and toxicity to fish of dietary and waterborne selenium. *Ecol. Bull.* **1983**, 35, 335–340.
152. National Research Council. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp; The National Academies Press: Washington, DC, USA, **2011**.
153. Labunsky, V.M.; Hatfield, D.L.; Gladyshev, V.N. Selenoproteins: Molecular pathways and physiological roles. *Physiol. Rev.* **2014**, 94, 739–777.
154. Roman, M.; Jitaru, P.; Barbante, C. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics* **2014**, 6, 25–54.
155. Mariotti, M.; Ridge, P.G.; Zhang, Y.; Lobanov, A.V.; Pringle, T.H.; Guigo, R.; Hatfield, D.L.; Gladyshev, V.N. Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. *PLoS One* **2012**, 7, 33066.
156. Arthur, J.R.; McKenzie, R.C.; Beckett, G.J. Selenium in the immune system. *J. Nutr.* **2003**, 133, 1457–1459.
157. Dalgaard, T.S.; Briens, M.; Engberg, R.M.; Lauridsen, C. The influence of selenium and selenoproteins on immune responses of poultry and pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 2018, 258, 73–83.
158. Kohshahi, A.J.; Sourinejad, I.; Johari, A.A. Dietary cosupplementation with curcumin and different selenium sources (nanoparticulate, organic, and inorganic selenium): influence on growth performance, body composition, immune responses, and glutathione

- peroxidase activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry* **2019**, 45, 793–804.
159. Burk, R.F.; Hill, K.E. Regulation of selenium metabolism and transport. *Ann. Rev. Nutr.* **2015**, 35, 109-134.
160. Suttle, N. Mineral Nutrition of Livestock, 4th ed.; Commonwealth Agricultural Bureaux International: Oxfordshire, UK, **2010**, p. 579.
161. National Research Council. Mineral. Tolerance of Animals; The National Academies Press: Washington, DC, USA, **2005**.
162. National Research Council. Nutrient Requirements of Swine; The National Academies Press: Washington, DC, USA, **2012**.
163. Hosnedlova, B.; Kepinska, M.; Skalickova, S.; Fernandez, C.; Ruttkay-Nedecky, B.; Malevu, T.D.; Sochor, J.S.; Baron, M.; Melcova, M.; Zidkova, J. A summary of new findings on the biological effects of selenium in selected animal species-A critical review. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 2209.
164. Fontagné-Dicharry, S.; Godin, S.; Liu, H.; Prabhu, P.A.J.; Bouyssiere, B.; Bueno, M.; Tacon, P.; Médale, F.; Kaushik, S.J. Influence of the forms and levels of dietary selenium on antioxidant status and oxidative stress-related parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Brit. J. Nutr.* **2015**, 113, 1876-1887.
165. Pacitti, D.; Lawan, M.M.; Sweetman, J.; Martin, S.A.M.; Feldmann, J.; Secombes, C.J. Selenium supplementation in fish: A combined chemical and biomolecular study to understand Sel-Plex assimilation and impact on selenoproteome expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLoS One* **2015**, 10, 0127041.
166. Penglase, S.; Hamre, K.; Ellingsen, S. The selenium content of SEPP1 versus selenium requirements in vertebrates. *Peer J.* **2015**, 1244.
167. Wang, L.; Zhang, X.; Wu, L.; Liu, Q.; Zhang, D.; Yin, J. Expression of selenoprotein genes in muscle is crucial for the growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets supplemented with selenium yeast. *Aquaculture* **2018**, 492, 82-90.
168. Berntssen, M.H.G.; Sundal, T.K.; Olsvik, P.A.; Amlund, H.; Rasinger, J.D.; Sele, V.; Hamre, K.; Hillsted, M.; Buttle, L.; Ørnsrud, R. Sensitivity and toxic mode of action of dietary organic and inorganic selenium in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.* **2017**, 192, 116-126.

169. Du, L.C.; Yu, H.R.; Li, L.Y.; Zhang, Q.; Tian, Q.; Liu, J.Q.; Shan, L.L. Dietary selenium requirement of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* W.) alevins. *Aquac. Int.* **2021**, *29*, 2291-2304.
170. Han, D.; Xie, S.; Liu, M.; Xiao, X.; Liu, H.; Zhu, X.; Yang, Y. The effects of dietary selenium on growth performances, oxidative stress and tissue selenium concentration of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Aquac. Nutr.* **2011**, *17*, 741–749.
171. Zhu, L.; Han, D.; Zhu, X.; Yang, Y.; Jin, J.; Liu, H.; Xie, S. Dietary selenium requirement for on-growing gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). *Aquac. Res.* **2016**, *48*, 2841-2851.
172. Wischhusen, P.; Parailous, M.; Geraert, P.-A.; Briens, M.; Bueno, M.; Mounicou, S.; Bouyssiere, B.; Prabhu, A.J.; Kaushik, S.; Fauconneau, B.; et al. Effect of dietary Se in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstock on antioxidant status, its parental transfer and oxidative status in the progeny. *Aquaculture* **2019**, *507*, 126–138.
173. Poston, H.A.; Combs, G.F.; Leibovitz, L. Vitamin E and selenium interrelations in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*): Gross, histological and biochemical deficiency signs. *J. Nutr.* **1976**, *106*, 892–904.
174. Gatlin, D.M., III; Wilson, R.P. Dietary selenium requirement of fingerling channel catfish. *J. Nutr.* **1984**, *114*, 627–633.
175. Ning, L.; Yuwen, T.; Wang, W.; Wu, S.; Chen, F.; Zhang, H.; Pan, Q. Optimum selenium requirement of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquac. Nutr.* **2020**, *26*, 528–535.
176. Zhu, Y.; Chen, Y.; Liu, Y.; Yang, H.; Liang, G.; Tian, L. Effect of dietary selenium level on growth performance, body composition and hepatic glutathione peroxidase activities of largemouth bass *Micropterus salmoide*. *Aquac. Res.* **2011**, *43*, 1660–1668.
177. Domínguez, D.; Sehnine, Z.; Castro, P.; Robaina, L.; Fontanillas, R.; Prabhu, P.A.J.; Izquierdo, M. Optimum selenium levels in diets high in plant-based feedstuffs for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fingerlings. *Aquac. Nutr.* **2019**, *26*, 579-589.
178. Liu, K.; Wang, X.J.; Ai, Q.; Mai, K.; Zhang, W. Dietary selenium requirement for juvenile cobia, *Rachycentron canadum* L. *Aquac. Res.* **2010**, *41*, 594-601.
179. Satoh, S.; Takeuchi, T.; Narabe, Y.; Watanabe, T. Effects of deletion of several trace elements from fish meal diets on growth and mineral composition of rainbow trout fingerlings. *Nippon Suisan Gakkaishi* **1983**, *49*, 1909–1916.



180. Gatlin, D.M., III; Wilson, R.P. Dietary selenium requirement of fingerling channel catfish. *J. Nutr.* **1984**, 114, 627–633.
181. Bell, J.G.; Cowey, C.B.; Adron, J.W.; Shanks, A.M. Some effects of vitamin E and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.* **1985**, 53, 149–157.
182. Rise, M.L.; von Schalburg, K.R.; Brown, G.D.; Mawer, M.A.; Devlin, R.H.; Kuipers, N.; Busby, M.; Beets-Sargent, M.; Alberto, R.; Gibbs, A.R.; Hunt, P.; Shukin, R.; Zeznik, J.A.; Nelson, C.; Jones, S.R.M.; Smailus, D.E.; Jones, S.J.M.; Schein, J.E.; Marra, M.A.; Butterfield, Y.S.N.; Stott, J.M.; Ng, S.H.S.; Davidson, W.S.; Koop, B.F. Development and application of a salmonid EST database and cDNA microarray: data mining and interspecific hybridization characteristics. *Genome Res.* **2004**, 14:478-490.
183. Wiseman, S.; Thomas, J.K.; Higley, E.; Hursky, O.; Pietrock, M.; Raine, J.C.; Giesy, J.P.; Janz, D.M.; Hecker, M. Chronic exposure to dietary selenomethionine increases gonadal steroidogenesis in female rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* **2011**, 105, 218-226.
184. Wang, C.L.; Lovell, R.T. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* **1997**, 152, 223-234.
185. Zee, J.; Patterson, S.; Gagnon, D.; Hecker, M. Adverse health effects and histological changes in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) exposed to dietary selenomethionine. *Environ. Toxicol. Chem.* **2016**, 35, 1741-1750.
186. Zee, J.; Patterson, S.; Wiseman, S.; Hecker, M. Is hepatic oxidative stress a main driver of dietary selenium toxicity in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*)? *Ecotoxicol. Environ. Safe.* **2016**, 133, 334-340.
187. Pedersen, T.V.; Block, M.; Part, P. Effect of selenium on the uptake of methyl mercury across perfused gills of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.* 1998, 40, 361-373.
188. Hamilton, S.J.; Buhl, K.J. Acute toxicity of boron molybdenum and selenium to fry of Chinook salmon and coho salmon. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1990**, 19, 366-373.
189. Berntssen, M.H.G.; Betancor, M.; Caballero, M.J.; Hillestad, M.; Rasinger, J.; Hamre, K.; Sele, V.; Amlund, H.; Ørnsrud, R. Safe limits of selenomethionine and selenite supplementation to plant-based Atlantic salmon feeds. *Aquaculture* **2018**, 495, 617–630.

190. Palace, V.P.; Spallholz, J.E.; Holm, J.; Wautier, K.; Evans, R.E.; Baron, C.L. Metabolism of selenomethionine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos can generate oxidative stress. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* **2004**, 58, 17-21.
191. Spallholz, J.E.; Palace, V.P.; Reid, T.W. Methioninase and selenomethionine but not S-methylselenocysteine generate methylselenol and superoxide in an in vitro chemiluminescent assay: implications for the nutritional carcinostatic activity of selenoamino acids. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, 67, 547-554.
192. Misra, S.; Hamilton, C.; Niyogi, S. Induction of oxidative stress by selenomethionine in isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. In Vitro* **2012**, 26, 621-629.
193. Berntssen, M.H.G.; Sundal, T.K.; Olsvik, P.A.; Amlund, H.; Rasinger, J.D.; Sele, V.; Hamre, K.; Hillestad, M.; Buttle, L.; Ørnsrud, R. Sensitivity and toxic mode of action of dietary organic and inorganic selenium in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.* **2017**, 192, 116-126.
194. Gobi, N.B.; Vaseeharan, B.; Rekha, R.; Vijayakumar, S.; Faggio, C. Bioaccumulation, cytotoxicity and oxidative stress of the acute exposure selenium in *Oreochromis mossambicus*. *Ecotox. Environ. Safe.* **2018**, 162, 147-159.
195. Naderi, M.; Salahinejad, A.; Jamwal, A.; Chivers, D.P.; Niyogi, S. Chronic dietary selenomethionine exposure induces oxidative stress, dopaminergic dysfunction, and cognitive impairment in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sic. Technol.* **2017**, 51, 12879-12888.
196. Naderi, M.; Salahinejad, A.; Ferrari, M.C.O.; Niyogi, S.; Chivers, D.P. Dopaminergic dysregulation and impaired associative learning behavior in zebrafish during chronic dietary exposure to selenium. *Environ. Pollut.* **2018**, 237, 174-185.
197. Rider, S.A.; Davies, S.J.; Jha, A.N.; Clough, R.; Sweetman, J.W. Bioavailability of co-supplemented organic and inorganic zinc and selenium sources in a white fishmeal-based rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diet. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2010**, 94, 99–110.
198. Sele, V.; Ørnsrud, R.; Sloth, J.J.; Berntssen, M.H.G.; Amlund, H. Selenium and selenium species in feeds and muscle tissue of Atlantic salmon. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2018**, 47, 124–133.
199. Le, K.T.; Fotedar, R. Bioavailability of selenium from different dietary sources in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture* **2014**, 420, 457–462.

200. Mechlaoui, M.; Dominguez, D.; Robaina, L.; Geraert, P.A.; Kaushik, S.; Saleh, R.; Briens, M.; Montero, D.; Izquierdo, M. Effects of different dietary selenium sources on growth performance, liver and muscle composition, antioxidant status, stress response and expression of related genes in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **2019**, 507, 251–259.
201. Godin, S.; Fontagné-Dicharry, S.; Bueno, M.; Tacon, P.; Prabhu, P.A.J.; Kaushik, S.; Médale, F.; Bouyssiere, B. Influence of dietary selenium species on selenoamino acid levels in rainbow trout. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 6484–6492.
202. Kumar, A.; Prasad, K.S. Role of nano-selenium in health and environment. *J. Biotechnol.* **2021**, 10, 325, 152-163.
203. Surai, P.; Kochish, I. Food for thought: nano-selenium in poultry nutrition and health. *Animal Health Research Reviews* **2020**, 21(2), 1-5.
204. Thakkar, K.N.; Mhatre S.S.; Parikh R.Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine* **2010**. 6(2), 257-262.
205. Pearce, C.I.; Coker, V.S.; Charnock, J.M.; Patrick, R.a.D.; Mosselmans, J.F.W.; Law, N.; Beveridge, T.J.; Lloyd, J.R. Microbial manufacture of chalcogenide- based nanoparticles via the reduction of selenite using *Veillonella atypica*: an in situ EXAFS study. *Nanotechnology* **2008**, 19(15), 1-13.
206. Dobias, J.; Suvorova E.I; Bernier-Latmani R. Role of proteins in controlling selenium nanoparticle size. *Nanotechnology* **2011**, 22(19), 195605.
207. Lee, J.-H.; Han, J.; Choi, H.; Hur, H.-G. Effects of temperature and dissolved oxygen on Se(IV) removal and Se(0) precipitation by *Shewanella* sp. HN-41. *Chemosphere* **2007**, 68(10), 1898-1905.
208. Hunter, W.; Kuykendall, L.D. Reduction of selenite to elemental red selenium by *Rhizobium* sp. strain B1. *Current Microbiology* **2007**, 55(4), 344-349.
209. Hunter, W.J.; Manter, D.K. Bio-reduction of selenite to elemental red selenium by *Tetrathio bacter kashmirensis*. *Current Microbiology* **2008**, 57(1), 83-88.
210. Losi, M.E.; Frankenberger, W.T. Reduction of selenium oxyanions by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1: Isolation and growth of the bacterium and its expulsion of selenium particles. *Applied and Environmental Microbiology* **1997**, 63(8), 3079-3084.
211. Oremland, R.S.; Herbel, M.J.; Blum, J.S.; Langley, S.; Beveridge, T.J.; Ajayan, P.M.; Sutto, T.; Ellis, A.V.; Curran, S. Structural and spectral features of selenium nanospheres

- produced by Se-respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **2004**, 70(1), 52-60.
212. Klonowska A.; Heulin T.; Vermeglio A. Selenite and tellurite reduction by *Shewanella oneidensis*. *Applied and Environmental Microbiology* **2005**, 71(9), 5607-5609.
213. Tomei, F.A.; Barton, L.L.; Lemanski, C.L.; Zocco, T.G.; Fink, N.H.; Sillerud, L.O. Transformation of selenate and selenite to elemental selenium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of Industrial Microbiology* **2005**, 14(3-4), 329-336.
214. Kessi, J.; Ramuz, M.; Wehrl, E.; Spycher, M.; Bachofen R. Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Applied and Environmental Microbiology* **1999**, 65(11), 4734-4740.
215. Mishra, B.; Hassan, P.A.; Priyadarsini K.I.; Mohan, H. 2005. Reactions of biological oxidants with selenourea: formation of redox active nanoselenium. *The Journal of Physical Chemistry B*. 109(26): 12718-12723.
216. Huang, B.; Zhang, J.S.; Hou, J.W.; Chen, C. Free radical scavenging efficiency of Nano-Se in vitro. *Free Radical Biology and Medicine* **2003**, 35(7), 805-813.
217. Hunter, W.; Manter D. Reduction of selenite to elemental red selenium by *Pseudomonas* sp. strain CA5. *Current Microbiology* **2009**, 58(5), 493-498.
218. Li, D.-B.; Cheng, Y.-Y.; Wu, C.; Li, W.-W.; Li, N.; Yang, Z.-C.; Tong, Z.-H.; Yu, H.-Q. Selenite reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 is mediated by fumarate reductase in periplasm. *Scientific Reports* **2014**, 4(3735), 1-7.
219. Demoll-Decker, H.; Macy, J.M. The periplasmic nitrite reductase of *Thauera selenatis* may catalyze the reduction of selenite to elemental selenium. *Archives of Microbiology* **1993**, 160(3), 241-247.
220. Kessi, J. Enzymic systems proposed to be involved in the dissimilatory reduction of selenite in the purple non-sulfur bacteria *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology-Uk* **2006**, 152(3), 731-743.
221. Antonioli, P.; Fortis, F.; Guerrier, L.; Rinalducci, S.; Zolla, L.; Righetti, P.G.; Boschetti, E. Capturing and amplifying impurities from purified recombinant monoclonal antibodies via peptide library beads: a proteomic study. *Proteomics* **2007**, 7(10), 1624-1633.
222. Bajaj, M.; Schmidt, S.; Winter, J. Formation of Se (0) nanoparticles by *Duganella* sp. and *Agrobacterium* sp. isolated from Se-laden soil of North-East Punjab, India. *Microbial Cell Factories* **2012**, 11(1), 1-14.

223. Zheng, S.; Su, J.; Wang, L.; Yao, R.; Wang, D.; Deng, Y.; Wang, R.; Wang, G.; Rensing C. Selenite reduction by the obligate aerobic bacterium *Comamonas testosteroni* S44 isolated from a metal-contaminated soil. *BMC Microbiology* **2014**, 14(1), 1-14.
224. Torres, S.K. Biosíntesis aeróbica y funcionalización de nanopartículas de selenio elemental. Tesis Magíster en Ciencias mención Microbiología. Universidad de Concepción, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, **2012**.
225. Lenz, M.; Lens, P.N.L. The essential toxin: The changing perception of selenium in environmental sciences. *Science of the Total Environment* **2009**, 407(12), 3620-3633.
226. Ošťádalová, I. Biological effects of selenium compounds with a particular attention to the ontogenetic development. *Physiological Research* **2012**, 61(Suppl. 1), S19-S34.
227. Arthur, J.R.; Nicol F.; Beckett G.J. Selenium deficiency, thyroid hormone metabolism, and thyroid hormone deiodinases. *The American Journal of Clinical Nutrition* **1993**, 57(2), 236S-239S.
228. Schomburg, L.; Riese, C.; Michaelis, M.; Griebert, E.; Klein, M.O.; Sapin, R., Schweizer, U.; Köhrle, J. Synthesis and metabolism of thyroid hormones is preferentially maintained in selenium-deficient transgenic mice. *Endocrinology* **2006**, 147(3), 1306-1313.
229. Wang, H.; Zhang, J.; Yu, H. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. *Free Radical Biology and Medicine* **2007**, 42(10), 1524-1533.
230. Shabani S.; Nourizadeh N.; Soltankhah M. The over expression of thioredoxin during malignancies. *Reviews in Clinical Medicine* **2014**, 1(4), 207-213.
231. Winkel, L.H.E.; Johnson, C.A., Lenz, M.; Grundl, T.; Leupin, O.X.; Amini, M.; Charlet, L. Environmental selenium research: From microscopic processes to global understanding. *Environmental Science & Technology* **2011**, 46(2), 571-579.
232. Wu, L. Review of 15 years of research on ecotoxicology and remediation of land contaminated by agricultural drainage sediment rich in selenium. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2004**, 57(3), 257-269.
233. Zhang, J.S.; Gao, X.Y.; Zhang, L.D.; Bao, Y.P. Biological effects of a nano red elemental selenium. *Biofactors* **2001**, 15(1), 27-38.
234. Zhang, J.; Wang, X.; Xu, T. Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with selenomethylselenocysteine in mice. *Toxicological Sciences* **2008**, 101(1), 22-31.

235. Sieber, F.; Daziano, J.-P.; Günther, W.H.H.; Krieg, M.; Miyagi, K.; Sampson, R.W.; Ostrowski, M.D.; Anderson, G.S.; Tsujino, I.; Bula, R.J. Elemental selenium generated by the photobleaching of selenomercyranine photosensitizers forms conjugates with serum macromolecules that are toxic to tumor cells. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **2005**, 180(3-4), 647-657.
236. Sarin, L.; Sanchez, V.C.; Yan, A.; Kane, A.B.; Hurt, R.H. Selenium-carbon bifunctional nanoparticles for the treatment of malignant mesothelioma. *Advanced Materials* **2010**, 22(45), 5207-5211.
237. Kojouri, G.A.; Jahanabadi, S.; Shakibaie, M.; Ahadi, A.M.; Shahverdi, A.R. Effect of selenium supplementation with sodium selenite and selenium nanoparticles on iron homeostasis and transferrin gene expression in sheep: A preliminary study. *Research in Veterinary Science* **2012**, 93(1), 275-278.
238. Sadeghian, S.; Kojouri, G.A.; Mohebbi, A. Nanoparticles of selenium as species with stronger physiological effects in sheep in comparison with sodium selenite. *Biological Trace Element Research* **2012**, 146(3), 302-308.
239. Yazdi, M.; Mahdavi, M.; Varastehmoradi, B.; Faramarzi, M.; Shahverdi, A. The immunostimulatory effect of biogenic selenium nanoparticles on the 4T1 breast cancer model: an in vivo study. *Biological Trace Element Research* **2012**, 149(1), 22-28.
240. Torres, S.K.; Campos, V.L.; León, C.G.; Rodríguez-Llamazares, S.M.; Rojas, S.M.; González, M.; Smith, C.T.; Mondaca, M.A. Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Pantoea agglomerans* and their antioxidant activity. *J. Nanoparticle Res.* 2012, 14, 1236.
241. Ravanal, J. Determinación de proteínas que participan en el control del tamaño de nanopartículas de selenio elemental producidas por *Pantoea agglomerans*. Bachelor's Thesis, University of Concepcion, Concepción, Chile, March **2015**.
242. Daza, C.; Campos, V.; Rojas, C.; Rodríguez-Llamazares, S.; Smith, C.; Mondaca, M. Reduction of selenite to elemental Selenium by *Pantoea agglomerans*. *Gayana* **2016**, 80, 67-74.
243. Vera, B. Bio-Obtención de Nanopartículas de Selenio y su Potencial Aplicación Como Suplemento Alimentario Inmunoestimulante en Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Bachelor's Thesis, University of Concepcion, Concepción, Chile, March **2016**.
244. Gajardo, B. Aislamiento de *Lactobacillus* sp. desde intestino de trucha arcoíris (*oncorhynchus mykiss*) con características probióticas y capacidad de generar

- nanoparticulas de selenio (SeNPs). Seminario de título para optar al título de Ingeniero en biotecnología marina y acuicultura. Universidad de Concepción, **2015**.
245. Chávez, C.; Dresdner, J.; Figueroa, Y.; Quiroga, M. Main issues and challenges for sustainable development of salmon farming in Chile: a socio-economic perspective. *Reviews in Aquaculture* **2019**, 11(2), 403-421.
246. Wendelaar Bonga, S.E. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 1997, 77(3), 591-625.
247. Filipovic, N.; Usjak, D.; Milenkovic, M.; Zheng, K.; Liverani, L.; Boccaccini, A.; Stevanovic, M. Comparative Study of the Antimicrobial Activity of Selenium Nanoparticles With Different Surface Chemistry and Structure. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, 8:624621.
248. Kumar, N.; Sheo, L.; Upadhyay, B. Facile and green synthesis of highly stable L-cysteine functionalized copper nanoparticles. *Applied Surface Science* **2016**, 385, 225-233.
249. Chai, F.; Wang, C.; Wang, T.; Ma, Z.; Su, Z. L-cysteine functionalized gold nanoparticles for the colorimetric detection of Hg<sup>2+</sup> induced by ultraviolet light. *Nanotechnology* **2010**, 21(2), 025501.
250. Arathi, A.; Joseph, X.; Akhil, V.; Mohanan, P.V. L-Cysteine capped zinc oxide nanoparticles induced cellular response on adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells using a conventional and organ-on-a-chip approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2022**, 211, 112300.
251. Perni, S.; Hakala, V.; Prokopovich, P. Biogenic synthesis of antimicrobial silver nanoparticles capped with L-cysteine. *Colloids Surf. A* **2013**, 460, 219–224.
252. Yu, Z.; Liu, B.; Pan, W.; Zhang, T.; Tong, L.; Li, N.; Tang, B. A simple approach for glutathione functionalized persistent luminescence nanoparticles as versatile platforms for multiple in vivo applications. *Chem. Commun.* **2018**, 54, 3504-3507.
253. Gotor-Prado, R.; Grueso, E. Noncovalent Interactions of Tiopronin-Protected Gold Nanoparticles with DNA: Two Methods to Quantify Free Energy of Binding. *Scientific World Journal* **2014**, 2014, 143645.
254. Forootanfar, H.; Adeli-Sardou, M.; Nikkhoo, M.; Mehrabani, M.; Amir-Heidari, B.; Shahverdi, A.R.; Shakibaie, M. Antioxidant and cytotoxic effect of biologically synthesized selenium nanoparticles in comparison to selenium dioxide. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2014**, 28, 75–79.

255. Dumore, N.; Mukhopadhyay, M. Antioxidant properties of aqueous selenium nanoparticles (ASeNPs) and its catalytic activity for 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) reduction. *Journal of Molecular Structure* **2019**, 1205,127637.
256. Mal, J.; Veneman, W.J.; Nanchaiah, Y.V.; van Hullebusch, E.D.; Peijnenburg, W.; Vijver, M.G.; Lens, P. A comparison of fate and toxicity of selenite, biogenically, and chemically synthesized selenium nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) embryogenesis. *Nanotoxicology* **2017**, 11(1), 87-97.
257. Sandmann, A.; Kompch, A.; Mackert, V.; Liebscher, C.H.; Winterer, M. Interaction of L-Cysteine with ZnO: Structure, Surface Chemistry, and Optical Properties. *Langmuir* **2015**, 31(21), 5701–5711.
258. Krumschnabel, G.; Ebner, H.L.; Hess, M.W.; Villunger, A. Apoptosis and necroptosis are induced in rainbow trout cell lines exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology* **2010**, 99(1), 73-85.
259. Mou, K.; Pan, W.; Han, D.; Wen, X.; Cao, F.; Miao, Y.; Li, P. Glycyrrhizin protects human melanocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage via the Nrf2-dependent induction of HO-1. *Int. J. Mol. Med.* **2019**, 44, 253–261.
260. Liu, Q.; Duan, B.; Xu, X.; Zhang, L. Progress in rigid polysaccharide-based nanocomposites with therapeutic functions. *Journal of Materials Chemistry B* **2017**, 5(29), 5690-5713.
261. Yu, J.; Dong, X.-d.; Jiao, J.-s.; Yua, S.-s.; Jia, H.-y.; Liu, A.-j.; Chen, Y. The inhibitory effects of selenium nanoparticles modified by fructose-enriched polysaccharide from *Codonopsis pilosula* on HepG2 cells. *Industrial Crops and Products* **2022**, 176, 114335.
262. Franco, M.E.; Sutherland, G.E.; Lavado, R. Xenobiotic metabolism in the fish hepatic cell lines Hepa-E1 and RTH-149, and the gill cell lines RTgill-W1 and G1B: Biomarkers of CYP450 activity and oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2018**, 206–207, 32–40.
263. Bopp, S.K.; Abicht, H.K.; Knauer, K. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquat. Toxicol.* **2008**, 86, 197–204.
264. Uçar, A.; Parlak, V.; Betül Özgeriş, F.; Yeltekin, A.; Alak, G.; Atamanalp, M. Determination of Fipronil toxicity by different biomarkers in gill and liver tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* **2020**, 56, 543-549.



265. Tkachenko, H.; Kurhaluk, N.; Grudniewska, J.; Andriichuk, A. Tissue-specific responses of oxidative stress biomarkers and antioxidant defenses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during a vaccination against furunculosis. *Fish Physiol. Biochem.* **2014**, *40*, 1289–1300.
266. Liu, Y-W.; Liong, M-T.; Tsai, Y-C. New perspectives of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic: The gut-heart-brain axis. *Journal of Microbiology* **2018**, *56*, 601-613.
267. Zommara, M.; Omran, M.; Ghanimah, M. Milk permeate medium for the production of selenium nanoparticles by lactic acid bacteria. *International Journal of Dairy Technology* **2022**, *75* (3), 603-610.
268. Kheradmand, E.; Rafii, F.; Yazdi, M.H.; Sepahi, A.A.; Shahverdi, H.R.; Oveisi, M.R. The antimicrobial effects of selenium nanoparticle-enriched probiotics and their fermented broth against *Candida albicans*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* **2014**, *22*, 48.
269. Castanho, S.; Califano, G.; Soares, F.; Costa, R.; Mata, L.; Pousao-Ferreira, P.; Ribeiro L. The effect of live feeds bathed with the red seaweed *Asparagopsis armata* on the survival, growth and physiology status of *Sparus aurata* larvae *Fish Physiol. Biochem.* **2017**, *43*, 1043-1054.
270. Dawood, M.A.O.; Zommara, M.; Eweedah, N.M.; Helal, A.I.; Aboel-Darag, M.A. The potential role of nano-selenium and vitamin C on the performances of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27*, 9843–9852.
271. Harsij, M.; Kanani, H.G.; Adineh, H. Effects of antioxidant supplementation (nano-selenium, vitamin C and E) on growth performance, blood biochemistry, immune status and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under sub-lethal ammonia exposure. *Aquaculture* **2020**, *521*, 734942.
272. Neamat-Allah, A.N.F.; Mahmoud, E.A.; Abd El Hakim, Y. Efficacy of dietary Nano-selenium on growth, immune response, antioxidant, transcriptomic profile and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* against *Streptococcus iniae* infection. *Fish Shellfish Immunol.* **2019**, *94*, 280–287.
273. Soltani, M.; Pakzad, K.; Taheri-Mirghaed, A.; Mirzargar, S.; Shekarabi, S.P.H.; Yosefi P.; Soleymani, N. Dietary application of the probiotic *Lactobacillus plantarum* 426951 enhances immune status and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **2019**, *11*(1):207-219.

274. Hang, B.T.B.; Balami, S.; Phuong, N.T. Effect of *Lactobacillus plantarum* on growth performance, immune responses, and disease resistance of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *AAFL Bioflux* **2022**, 15(1), 174-187.
275. Son, V.M.; Chang, C-C.; Wu, M-C.; Guu, Y-K.; Chiu, C-H.; Cheng, W. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology* **2009**, 26(5), 691-698.
276. Shang, X.; Wang, B.; Sun, Q.; Zhang, Y.; Lu, Y.; Liu, S.; Li, Y. Selenium-enriched *Bacillus subtilis* reduces the effects of mercury-induced on inflammation and intestinal microbes in carp (*Cyprinus carpio var. specularis*). *Fish Physiology and Biochemistry* **2022**, 48, 215-226.
277. Hampton, L.M.T.; Jeffries, M.K.S.; Venables, B.J. A practical guide for assessing respiratory burst and phagocytic cell activity in the fathead minnow, an emerging model for immunotoxicity. *MethodsX* **2020**, 7, 100992.
278. Dawood, M.A.O.; Zommara, M.; Eweedah, N.M.; Helal, A.I. Synergistic Effects of Selenium Nanoparticles and Vitamin E on Growth, Immune-Related Gene Expression, and Regulation of Antioxidant Status of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biol. Trace Elem. Res.* **2019**, 195, 624-635.
279. Xia, I.F.; Cheung, J.S.; Wu, M.; Wong, K.-S.; Kong, H.; Zheng, X.; Ka-Hing Wong, K.-H.; Kwok, K.W. Dietary chitosan-selenium nanoparticle (CTS-SeNP) enhance immunity and disease resistance in zebrafish. *Fish Shellfish Immunol.* **2019**, 87, 449–459.
280. Dawood, M.A.O.; Koshio, S.; Zaineldin, A.I.; Van Doan, H.; Moustafa, E.M.; Abdel-Daim, M.M.; Angeles Esteban, M.; Hassaan, M.S. Dietary supplementation of selenium nanoparticles modulated systemic and mucosal immune status and stress resistance of red sea bream (*Pagrus major*). *Fish Physiol. Biochem.* **2019**, 45, 219–230.
281. Ayoub, H.F.; Tohamy, E.Y.; Salama, H.M.; Mohamed, S.S. *Citrullus colocynthis* extract and synthesized selenium nanoparticles enhance non-specific response and resistance against *Aeromonas sobria* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Res.* **2021**, 52(10), 4969-4982.
282. Abd El-Kader, M.F.; Fath El-Bab, A.F.; Shoukry, M.; Abdel-Warith, A.-W.A.; Younis, E.M.; Moustafa, E.M.; El-Sawy, H.B.; Ahmed, H.A.; Van Doan, H.; Dawood, M.A.O. Evaluating the possible feeding strategies of selenium nanoparticles on the growth rate

- and wellbeing of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquac. Rep.* **2020**, 18, 100539.
283. Abd El-Kader, M.F.; Fath El-Bab, A.F.; Abd-Elghany, M.F.; Abdel-Warith, A.-W.A.; Younis, E.M.; Dawood, M.A.O. Selenium nanoparticles act potentially on the growth performance, hemato-biochemical indices, antioxidative, and immune-related genes of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol. Trace Elem. Res.* **2021**, 199, 3126-3134.
284. Kumar, N.; Krishnani, K.K.; Gupta, S.K.; Sharma, R.; Baitha, R.; Singh, D.K.; Singh, N.P. Immuno-protective role of biologically synthesized dietary selenium nanoparticles against multiple stressors in *Pangasinodon hypophthalmus*. *Fish Shellfish Immunol.* **2018**, 78, 289-298.
285. Soltani, M.; Abdy, E.; Alishahi, M.; Mirghaed, A.Y.; Hosseini-Shekarabi, P. Growth performance, immune-physiological variables and disease resistance of common carp (*Cyprinus carpio*) orally subjected to different concentrations of *Lactobacillus plantarum*. *Aquaculture International* **2017**, 25, 1913-1933.
286. Chen, L.; Pan, D-D.; Zhou, J.; Jiang, Y-Z. Protective effect of selenium-enriched lactobacillus on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in mice and its possible mechanisms. *World J Gastroenterol.* **2005**, 11(37), 5795-5800.
287. Zhao, C.; Chen, H.; Liang, H.; Zhao, X.; Tang, W.; Wei, M.; Li, Y.; Zhang, J.; Yu, X.; Chen, G.; Zhu, H.; Jiang, L.; Zhang, X. Erratum: *Lactobacillus plantarum* RS-09 Induces M1-Type Macrophage Immunity Against *Salmonella typhimurium* Challenge via the TLR2/NF- $\kappa$ B Signalling Pathway. *Front Pharmacol.* **2022**, 13, 937618.
288. Hoseinifar, S.H.; Yousefi, S.; Doan, H.V.; Ashouri, G.; Gioacchini, G.; Maradonna, F.; Carnevali, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Fish: The Implications of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotics, *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* **2021**, 29(2), 198-217.
289. Niki, E. Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? *FEBS Lett.* **2012**, 586, 3767-3770.
290. Magnoni, L.J.; Martos-Sitcha, J.A.; Queiroz, A.; Caldusch-Giner, J.A.; Magalhães Gonçalves, J.F.; Rocha, C.M.R.; Abreu, H.T.; Schrama, J.W.; Ozorio, R.O.A.; Pérez-Sánchez, J. Dietary supplementation of heat-treated Gracilaria and Ulva seaweeds enhanced acute hypoxia tolerance in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biol Open* **2017**, 6 (6), 897-908.

291. Saffari, S.; Keyvanshokoo, S.; Zakeri, M.; Johari, S.A.; Pasha-Zanoosi, H. Effects of different dietary selenium sources (sodium selenite, selenomethionine and nanoselenium) on growth performance, muscle composition, blood enzymes and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Nutrition* **2017**, 23(3), 611-617.
292. Naderi, M.; Keyvanshokoo, S.; Salati A.; Ghaedi, A. Proteomic analysis of liver tissue from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under high rearing density after administration of dietary vitamin E and selenium nanoparticles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* **2017**, 22, 10-19.
293. Mengistu, B.M.; Bitsue, H.K.; Huang, K. The Effects of Selenium-Enriched Probiotics on Growth Performance, Oocysts Shedding, Intestinal Cecal Lesion Scores, Antioxidant Capacity, and mRNA Gene Expression in Chickens Infected with *Eimeria tenella*. *Biological Trace Element Research* **2021**, 199, 278–291.
294. Sagada, G.; Wang, L.; Xu, B.; Chen, Y.; Chen, K.; Sun, Y.; Volatiana, J.A.; Shao, Q. Effect of dietary inactivated *Lactobacillus plantarum* and selenomethionine supplementation on growth performance and health-related indices of black sea bream (*Acanthopagrus Schlegelii*) fingerlings. *Aquaculture Nutrition* **2021**, 27(5), 1529-1543.
295. Dawood, M.A.O.; Koshio, S.; Zaineldin, A.I.; Van Doan, H.; Ahmed, H.A.; Elsabagh, M.; Abdel-Daim, M.M. An evaluation of dietary selenium nanoparticles for red sea bream (*Pagrus major*) aquaculture: Growth, tissue bioaccumulation, and antioxidative responses. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019**, 26, 30876-30884.
296. Ghazi, S.; Diab, A.M.; Khalafalla, M.M.; Mohamed, R.A. Synergistic effects of selenium and zinc oxide nanoparticles on growth performance, hemato-biochemical profile, immune and oxidative stress responses, and intestinal morphometry of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biological Trace Element Research* **2022**, 200, 364-374.
297. Naderi, M.; Keyvanshokoo, S.; Salati A.; Ghaedi, A. Effects of dietary vitamin E and selenium nanoparticles supplementation on acute stress responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) previously subjected to chronic stress. *Aquaculture* **2017**, 473, 215-222.
298. Harsij, M.; Kanani, H.G.; Adineh, H. Effects of antioxidant supplementation (nanoselenium, vitamin C and E) on growth performance, blood biochemistry, immune status and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under sub-lethal ammonia exposure. *Aquaculture* **2020**, 521, 734942.

299. Rautela, A.; Rani, J.; Das, M.D. Green synthesis of silver nanoparticles from *Tectona grandis* seeds extract: Characterization and mechanism of antimicrobial action on different microorganisms. *J. Anal. Sci. Technol.* **2019**, *10*, 5.
300. Fang, X.; Wang, Y.; Wang, Z.; Jiang, Z.; Dong, M. Microorganism Assisted Synthesized Nanoparticles for Catalytic Applications. *Energies* **2019**, *12*, 190.
301. Corr, S.C.; Hill, C.; Gahan, G.M. Chapter 1 Understanding the Mechanisms by Which Probiotics Inhibit Gastrointestinal Pathogens. *Advances in Food and Nutrition Research* **2009**, *56*, 2009, 1-15.
302. Iacob, S.; Diana Gabriela Iacob, D.G. Infectious Threats, the Intestinal Barrier, and Its Trojan Horse: Dysbiosis. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1676.
303. Van Doan, Hoseinifar, S.H.; Ringø, E.; Esteban, M.A.; Dadar, M.; Dawood, M.A.O.; Faggio, C. Host-Associated Probiotics: A Key Factor in Sustainable Aquaculture. *Reviews in fisheries science & Aquaculture* **2019**, doi: 10.1080/23308249.2019.1643288.
304. Jatobá, A.; Pereira, M. O.; Vieira, L.M.; Bitencourt, M.; Rodrigues, E.; Fachini, F.A.; Moraes, A. V. Action time and feed frequency of *Lactobacillus plantarum* for Nile tilapia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **2018**, *70*(1), 327-332.
305. Parthasarathy, R.; Ravi, D. Probiotic bacteria as growth promoter and biocontrol agent against *Aeromonas hydrophila* in *Catla catla* (Hamilton, 1822). *Indian Journal of Fisheries* **2011**, *58*(3), 87-93.
306. Giri, S.S.; Sukumaran, V.; Oviya, M. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunol* **2013**, *34*(2), 660–666.
307. Raza A. Effects of graded levels of dietary selenium supplementation on the growth of juvenile mahseer (*Tor putitora*). Tesis para optar al grado de Master of Philosophy, Quaid-i-Azam University, Pakistán. **2012**.
308. Dawood, M.A.O.; Zommara, M.; Eweedah, N.M.; Helal, A.I.; Aboel-Darag M.A. The potential role of nano-selenium and vitamin C on the performances of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) *Environ. Sci. Pollution Res.* **2020**, *27*, 9843-9852.
309. Zhou, X.; Wang, Y.; Gu, Q.; Li, W. Effects of different dietary selenium sources (selenium nanoparticle and selenomethionine) on growth performance, muscle composition and glutathione peroxidase enzyme activity of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Aquaculture* **2009**, *291*(1), 78-81.

310. Guo, C.; Chen, X.; Song, H.; Maynard, M.A.; Zhou, Y.; Lobanov, A.V.; Gladyshev, V.N.; Ganis, J.J.; Wiley, D.; Jugo, R.H.; Lee, N.Y.; Castroneves, L.A.; Zon, L.I.; Scanlan, T.S.; Feldman, H.A.; Huang, S.A. Intrinsic Expression of a Multiexon Type 3 Deiodinase Gene Controls Zebrafish Embryo Size. *Endocrinology* **2014**, 155(10), 4069-4080.
311. Farchi-Pisanty, O.; Sternberg, H.; Moav, B. Transcriptional regulation of fish growth hormone gene. *Fish Physiology and Biochemistry* **1997**, 17, 237-246.
312. Khan, K.U.; Zuberi, A.; Nazir, S.; Ullah, I.; Jamil, Z.; Sarwar, H. Synergistic effects of dietary nano selenium and vitamin C on growth, feeding, and physiological parameters of mahseer fish (*Tor putitora*). *Aquaculture Reports* 2017, 5, 70-75.
313. Longbaf Dezfouli, M.; Ghaedtaheri, A.; Keyvanshokoo, S.; Salati, A.P.; Mousavi, S.M.; Pasha-Zanoosi, H. Combined or individual effects of dietary magnesium and selenium nanoparticles on growth performance, immunity, blood biochemistry and antioxidant status of Asian seabass (*Lates calcarifer*) reared in freshwater. *Aquac. Nutr.* **2019**, 25, 1422-1430.
314. Dawood, M.A.O. Nutritional immunity of fish intestines: Important insights for sustainable aquaculture. *Rev. Aquac.* **2021**, 13, 642-663.
315. Van Doan, H.; Doolgindachbaporn, S.; Suksri, A. Effects of low molecular weight agar and *Lactobacillus plantarum* on growth performance, immunity, and disease resistance of basa fish (*Pangasius bocourti*, Sauvage 1880). *Fish & Shellfish Immunology* **2014**, 41(2), 340-345.

## CAPÍTULO VIII

### ANEXOS



## Proyecciones

Los resultados obtenidos en este trabajo abren la necesidad de seguir indagando en los aspectos microbiológicos y biotecnológicos para obtener Se<sup>0</sup>Nps con mayores actividades biológicas y con distintas aplicaciones como, por ejemplo, Se<sup>0</sup>Nps transportadoras de moléculas en su superficie para generar respuestas específicas dirigidas a potenciar aspectos productivos o tratar enfermedades de manera más eficiente y con menor impacto orgánico.

También proyectamos, a partir de la presente investigación, el uso de las Se<sup>0</sup>Nps para modular procesos fisiológicos ya que hemos observado la emergencia de estudios iniciales que usan Se para regular la expresión de genes, entre otros, del sistema inmune.

Finalmente, el comprender los efectos de las Se<sup>0</sup>Nps incluidas como suplemento nutricional en la microbiota intestinal es necesario. Algunos estudios dan luces de que las Se<sup>0</sup>Nps mejorarían la funcionalidad de la microbiota de forma directa e indirecta.





## **SOBRE EL AUTOR**

Francisco Yáñez Lemus, Candidato a Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, Diplomate in Biomedical Sciences (Albert Ludwigs Universität Freiburg, Alemania) y Médico Veterinario de la Universidad Austral de Chile, con interés en el desarrollo de innovaciones biotecnológicas orientadas hacia el mejoramiento de la producción y salud animal.

### **Artículos científicos generados durante el Doctorado (2013-2022)**

1. Campos, V.; Moraga, R.; Fernández, I.; **Yáñez, F.**; Valenzuela, A.; Mondaca, M.A. Reduction of Hexavalent chromium by *Serratia marcescens* immobilized on active carbon and their potencial use in bioremediation. *Gayana* **2013**, 77 (1), 60-63.
2. Fernández, I.; Retamal, M.; Mansilla, M.; **Yáñez, F.**; Campos, V.; Smith, C.; Puentes, G.; Valenzuela, A.; González, H. Analysis of epibiont data in relation with the Debilitated Turtle Syndrome of sea turtles in *Chelonia mydas* and *Lepidochelys olivacea* from Concepción coast, Chile. *Lat Am J Aquat Res* **2015**, 43(5), 1024-1029.
3. Fernández, I.; Moraga, R.; **Yáñez, F.**; Mansilla, M.; Smith, C.; Campos, V. Gastrointestinal helminths of wild Humboldt penguins *Spheniscus humboldti* (Meyen, 1834) from the south-central coast of Chile. *Lat Am J Aquat Res* **2019**, 47(1), 206-211.
4. **Yanez-Lemus, F.**, Moraga, R., Mercado, L., Jara, C., Smith, C.T., Aguayo, P., Sanchez-Alonso, K.M., Garcia-Cancino, A., Valenzuela, A., Campos, V.L. Selenium Nanoparticles Biosynthesized by *Pantoea agglomerans* and Their Effects on Cellular and Physiological Parameters in the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Biology* **2022**, 11, 463.
5. **Yanez-Lemus, F.**, Moraga, R., Smith, C.T., Aguayo, P., Sanchez-Alonso, K.M., Garcia-Cancino, A., Valenzuela, A., Campos, V.L. Selenium nanoparticle-enriched and a potential probiotic, the strain *Lactiplantibacillus plantarum* S14 as nutritional supplement to improve physiological and productive parameters of rainbow trout. *Biology* **2022**, 11, 1523.

### Artículos en revisión

Fernández, I.; Moraga, R.; **Yáñez-Lemus, F**; Mansilla, M.; Smith, C.; Campos, V. Gastrointestinal helminths of wild Magellanic penguins *Spheniscus magellanicus* (Foster, 1781) from the south-central coast of Chile.

### **Participación en congresos y sesión de posters**

**Yáñez-Lemus F**, Moraga R, Ravanal J, Vera B, Mercado L, Jara C, Smith CT, Mondaca MA, Campos VL. L-cysteine functionalized biogenic Selenium nanoparticles: Are these a biotechnological improvement for salmonid nutrition? Trabajo aceptado en el XXXIX Congreso Ciencias del Mar. Iquique, Chile. Mayo 27-31. **2019**.

**Yáñez-Lemus F**, Moraga R, Mercado L, Jara C, Smith C, Aguayo P, Sanchez-Alonso KM, Garcia A, Valenzuela A, Campos V. Biosynthesized selenium nanoparticles, a biotechnological alternative as feed supplement for salmonid fish nutrition. Congreso Digital de la Sociedad de Microbiología de Chile (SOMICH) / 4ID<sup>MR</sup> Congress Play. Diciembre 2-4. **2020**.

**Yáñez-Lemus F**, Moraga R, Mercado L, Jara C, Smith C, Aguayo P, Sanchez-Alonso KM, Garcia A, Valenzuela A, Campos V. Selenium nanoparticles biosynthesized by *Pantoea* agglomerans: A biotechnological alternative for the dietary supplementation of cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Poster Day. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. Mayo 6. **2022**.