



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TESIS DOCTORAL

Influencia de dietas funcionales con algas y probióticos en las mucosas de peces de interés acuícola

Isabel María Cerezo Ortega

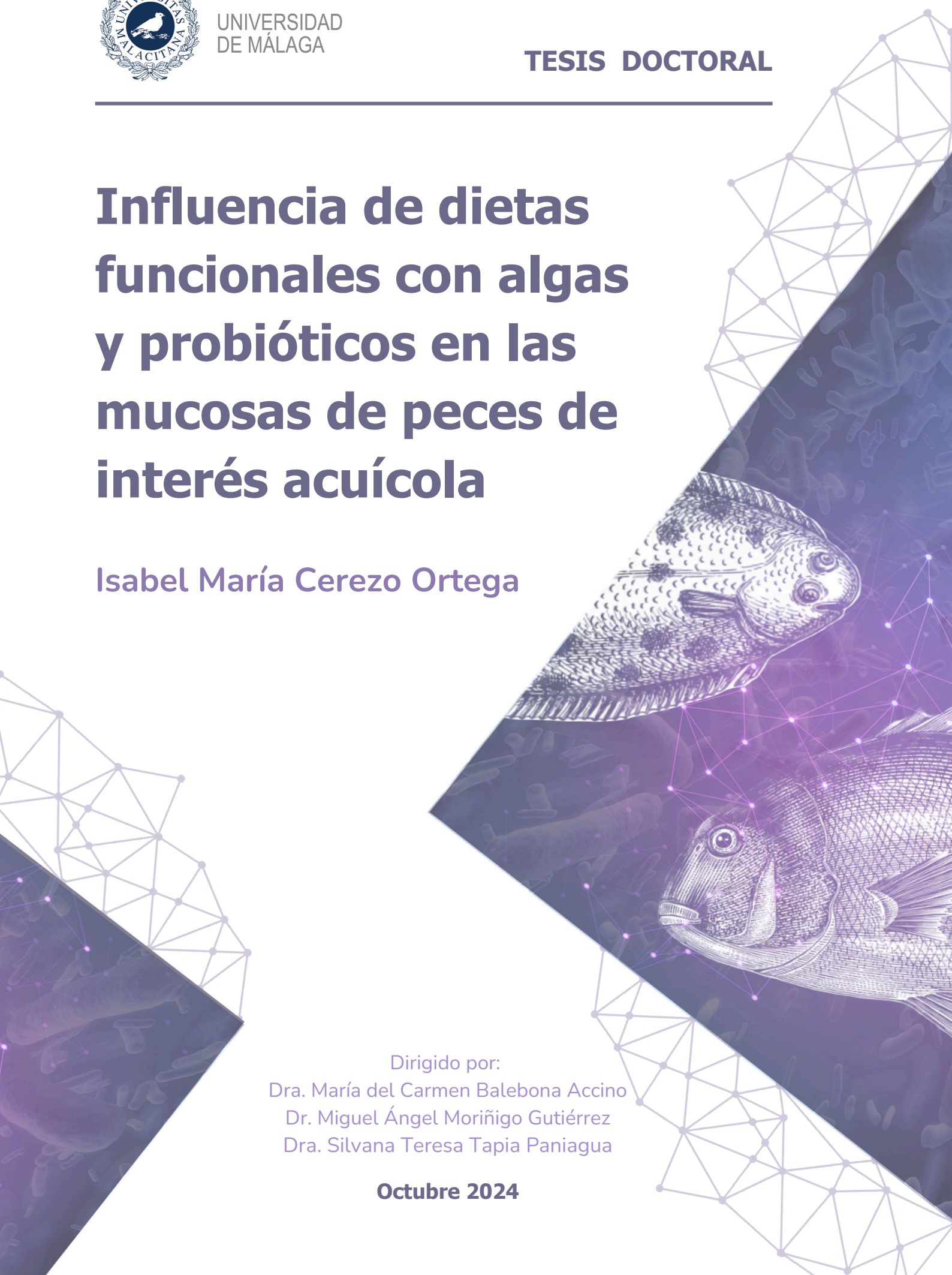
Dirigido por:

Dra. María del Carmen Balebona Accino

Dr. Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez

Dra. Silvana Teresa Tapia Paniagua

Octubre 2024





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**Influencia de dietas funcionales con algas y probióticos en
las mucosas de peces de interés acuícola**

Memoria presenta por Dña. Isabel María Cerezo Ortega
para optar al título de doctora

Programa de Doctorado en Biología Celular y Molecular

Tesis doctoral monográfica

Tesis dirigida por:

Dra. María del Carmen Balebona Accino

Dr. Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez

Dra. Silvana Teresa Tapia Paniagua

Tutor académico: Dr. Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez

Málaga, Septiembre 2024



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTORA: Isabel María Cerezo Ortega

 <https://orcid.org/0000-0002-9265-3732>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



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

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

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

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

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



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

TESIS DOCTORAL

**Influencia de dietas funcionales con algas y probióticos en
las mucosas de peces de interés acuícola**

Memoria presenta por Dña. Isabel María Cerezo Ortega
para optar al título de doctora

Programa de Doctorado en Biología Celular y Molecular

Fdo. Isabel María Cerezo Ortega

Málaga, Septiembre 2024



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

El Dr. D. Juan José Borrego García, Catedrático de Microbiología y Director del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

INFORMA QUE:

Dña. Isabel María Cerezo Ortega ha realizado en los laboratorios de este Departamento el trabajo experimental conducente a la elaboración de la presente memoria de la presente Tesis Doctoral titulada “Influencia de dietas funcionales con algas y probióticos en las mucosas de peces de interés acuícola”.

Y para que así conste firma el presente documento,



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



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

D./Dña ISABEL MARÍA CERESO ORTEGA

Estudiante del programa de doctorado BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: INFLUENCIA DE DIETAS FUNCIONALES CON ALGAS Y PROBIÓTICOS EN LAS MUCOSAS DE PECES DE INTERÉS ACUÍCOLA

Realizada bajo la tutorización de MIGUEL ÁNGEL MORIÑIGO GUTIÉRREZ y dirección de MARÍA DEL CARMEN BALEBONA ACCINO, MIGUEL ÁNGEL MORIÑIGO GUTIÉRREZ Y SILVANA TERESA TAPIA PANIAGUA (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

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

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

En Málaga, a 4 de SEPTIEMBRE de 2024

Fdo.: ISABEL M ^a CERESO ORTEGA Doctorando/a	Fdo.: MIGUEL ÁNGEL MORIÑIGO GUTIÉRREZ Tutor/a
Fdo.: MARIA DEL CARMEN BALEBONA ACCINO	



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

MIGUEL ÁNGEL MORIÑIGO GUTIÉRREZ

SILVANA TERESA TAPIA PANIAGUA

Director/es de tesis

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



EFQM AENOR



Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.
29071
Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10
E-mail: doctorado@uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Dra. María del Carmen Balebona Accino, Dr. Miguel A. Moriñigo Gutiérrez y
Dra. Silvana Teresa Tapia Paniagua, profesores/as de la Universidad de Málaga,

HACEN CONSTAR:

La presente memoria titulada “Influencia de dietas funcionales con algas y probióticos en las mucosas de peces de interés acuícola” presentada por Dña. Isabel María Cerezo Ortega para optar al grado de Doctora por la Universidad de Málaga, ha sido realizada en dicha universidad bajo su dirección. Autorizan, por tanto, su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente, y certifican que las publicaciones empleadas para avalar esta Tesis Doctoral no han sido previamente utilizadas en otras tesis doctorales.

Y para que así conste firman el presente documento,



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Financiación

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

- Proyecto de Jóvenes Investigadores (CEIJ-C05.3) de la fundación CEIMAR.
- Subvención RTA2014-00023 C02 del Ministerio de Economía y Competitividad, cofinanciada por fondos FEDER.
- Proyecto UMA20-FEDERJA-016 del Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020 y el Ministerio de Economía y Competitividad (PID2020-113637RB-C22).
- Subvenciones del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL-2017-83370-C1-R y AGL-2017-83370-C3-R).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Publicaciones

Los resultados obtenidos a partir de los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral, hasta el momento de su entrega, han sido documentados en las siguientes publicaciones científicas, recogidas en el apartado ANEXO.

CAPÍTULO 1. Efectos de una dieta suplementada con la microalga *Nannochloropsis gaditana* sobre la microbiota y expresión de genes implicados en la barrera intestinal de doradas.

- Cerezo-Ortega, I. M., Di Zeo-Sánchez, D. E., García-Márquez, J., Ruiz-Jarabo, I., Sáez-Casado, M. I., Balebona, M. C., Moriñigo M. A. & Tapia-Paniagua, S. T. (2021). Microbiota composition and intestinal integrity remain unaltered after the inclusion of hydrolysed *Nannochloropsis gaditana* in *Sparus aurata* diet. *Scientific Reports*, 11(1), 18779. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98087-5>

CAPÍTULO 3. Estudio del efecto sobre la microbiota y la respuesta transcriptómica de la piel dañada de *Sparus aurata* tras la administración de una dieta adicionada con el probiótico *Shewanella putrefaciens* SpPdp11.

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

CAPÍTULO 4. Análisis del efecto de la alimentación con una dieta suplementada con la macroalga *Ulva ohnoi* sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*.

- Cerezo, I. M., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S. T., Bautista, R., Anguís, V., Fernández-Díaz, C., Alarcón F. J., Moriñigo M. A. & Balebona, M. C. (2022). *Solea senegalensis* bacterial intestinal microbiota is affected by low dietary inclusion of *Ulva ohnoi*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 801744. <https://doi.org/10.3390/ani13020193>

Asimismo, para el desarrollo profesional de la doctoranda, ha contribuido en la autoría de un capítulo de libro y otros artículos científicos, referenciados a continuación:

- Cámara-Ruiz, M., Cerezo, I. M., Guardiola, F. A., García-Beltrán, J. M., Balebona, M. C., Moriñigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2021). Alteration of the immune response and the microbiota of the skin during a natural Infection by *Vibrio harveyi* in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Microorganisms*, 9(5), 964. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050964>
- Cámara-Ruiz, M., García-Beltrán, J. M., Cerezo, I. M., Balebona, M. C., Moriñigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2022). Immunomodulation and skin microbiota perturbations during an episode of chronic stress in gilthead seabream. *Fish & Shellfish Immunology*, 122, 234-245. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.02.011>
- Cerezo, I.M., Domínguez-Maqueda, M., Carmen Balebona, M., Martínez-Manzanares, E., Arijó, S. (2022). Application methods of probiotics and options. In: Austin, B., Sharifuzzaman, S. (eds), *Probiotics in Aquaculture*. Springer, 25-52. https://doi.org/10.1007/978-3-030-98621-6_3

- Domínguez-Maqueda, M., Cerezo, I. M., Tapia-Paniagua, S. T., De La Banda, I. G., Moreno-Ventas, X., Moriñigo, M. Á., & Balebona, M. C. (2021). A tentative study of the effects of heat-inactivation of the probiotic strain *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) intestinal microbiota and immune response. *Microorganisms*, 9(4), 808. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040808>
- Firmino, J. P., Vallejos-Vidal, E., Balebona, M. C., Ramayo-Caldas, Y., Cerezo, I. M., Salomón, R., Tort L., Estévez A., Moriñigo, M. A., Reyes-López F. E. & Gisbert, E. (2021). Diet, immunity, and microbiota interactions: an integrative analysis of the intestine transcriptional response and microbiota modulation in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed an essential oils-based functional diet. *Frontiers in Immunology*, 12, 625297. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.625297>
- García-Márquez, J., Álvarez-Torres, D., Cerezo, I. M., Domínguez-Maqueda, M., Figueroa, F. L., Alarcón, F. J., Acien, G., Martínez-Manzanares E., Abdala-Díaz, R., & Arijo, S. (2023). Combined dietary administration of *Chlorella fusca* and ethanol-inactivated *Vibrio proteolyticus* modulates intestinal microbiota and gene expression in *Chelon labrosus*. *Animals*, 13(21), 3325. <https://doi.org/10.3390/ani13213325>
- García-Márquez, J., Álvarez-Torres, D., Cerezo, I. M., Domínguez-Maqueda, M., Acien, G., Alarcón-López, F. J., Figueroa, F. L., Martínez-Manzanares, E., Abdala-Díaz, R., Béjar, J. & Arijo, S. (2024). Effects of *Chlorella fusca*-supplemented diet on intestinal microbiota and gene expression related to metabolism, stress, and immune response in *Chelon labrosus*. *Algal Research*, 77, 103362. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103362>
- García-Márquez, J., Cerezo, I. M., Figueroa, F. L., Abdala-Díaz, R. T., & Arijo, S. (2022). First evaluation of associated gut microbiota in wild thick-lipped grey mullets (*Chelon labrosus*, Risso 1827). *Fishes*, 7(4), 209. <https://doi.org/10.3390/fishes7040209>
- García-Márquez, J., Domínguez-Maqueda, M., Torres, M., Cerezo, I. M., Ramos, E., Alarcón, F. J., Mancera, J. M., Martos-Sitcha, J.A., Moriñigo, M. A., & Balebona, M. C. (2023). Potential Effects of microalgae-supplemented diets on the growth, blood parameters, and the activity of the intestinal microbiota in *Sparus aurata* and *Mugil cephalus*. *Fishes*, 8(8), 409. <https://doi.org/10.3390/fishes8080409>
- Guimarães, M. C., Cerezo, I. M., Fernandez-Alarcon, M. F., Natori, M. M., Sato, L. Y., Kato, C. A., Moriñigo, M. A., Tapia-Paniagua, S. T., de Carla D., Massatoshi C., Ranzani-Paiva, M.J., Lucena, L., Bach, E. E., Cliassa, P. B., Orefice, D. P. & Tachibana, L. (2022). Oral administration of probiotics (*Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) vaccinated and challenged with *Streptococcus agalactiae*. *Fishes*, 7(4), 211. <https://doi.org/10.3390/fishes7040211>
- Sanahuja, I., Ruiz, A., Firmino, J. P., Reyes-López, F. E., Ortiz-Delgado, J. B., Vallejos-Vidal, E., Tort L., Tovar-Ramírez, D., Cerezo, I. M., Moriñigo, M. A., Sarasquete C. & Gisbert, E. (2023). *Debaryomyces hansenii* supplementation in low fish meal diets promotes growth, modulates microbiota and enhances intestinal condition in juvenile marine fish. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s40104-023-00895-4>

"Como no estás experimentado en las cosas del mundo,
todas las cosas que tienen algo de dificultad te parecen imposibles;
pero andará el tiempo... "

Miguel de Cervantes Saavedra (El Quijote)

A mis abuelos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Agradecimientos

No podría concluir esta Tesis Doctoral sin mencionar a todos aquellos que, de una u otra manera, han hecho posible que llegue a su fin. Por ello, me gustaría dedicar estas líneas para expresarles mi más sincero agradecimiento.

Quiero resaltar el trabajo de mis directores, quienes no solo han sido guía imprescindible en este documento, sino que también me han dado la oportunidad de realizarme profesionalmente. A Miguel A. Moriñigo porque, aunque le pese, ha sido como un padre en la ciencia; gracias por confiar en mí cuando ni yo lo hacía, por ir soltándome las alas poco a poco, pero sobre todo, por saber que siempre he tenido abierto tu despacho y tu teléfono. A M^a Carmen Balebona, por la dulzura que te caracteriza, tu perfección en todo lo que haces y por saber que siempre puedo contar contigo. A Silvana, por aportar tu toque actual, por hacerme partícipe de tantas ideas como se te iban ocurriendo y porque da igual cuando te mande el WhatsApp, que sé que estarás ahí para contestarme.

A mis compañeros en este viaje, que tanto en el laboratorio como fuera de él, se han convertido en grandes amigos. A Jorge y Olivia, por nunca borrar esa sonrisa aunque las cosas se compliquen y encontrar siempre las mejores palabras de ánimo. A nuestros vecinos Laura, Rocío L. y Alex, que te esperan con una cerveza al sol, haciéndote olvidar cualquier problema. A Dani, que nadie nos separaba ni para cargar una PCR, y aunque ahora nos separen los edificios, te siento igual de cerca. Y por supuesto, a Marta y Jorge García, porque no sé que hubiera sido de este camino sin vosotros. Me habéis demostrado lo que significa la palabra compañeros desde el primer momento, haciéndome sentir que nunca he estado sola y que todo es posible. Gracias por ser mis personas vitamina, y aunque a veces uno estará arriba y el otro abajo, nos estaremos empujando a lograr nuestros sueños.

También quiero dar las gracias a mis fantásticos compañeros de SCBI donde he pasado gran parte de este tiempo, ha sido una alegría poder compartir tantas risas y charlas con todos vosotros. En especial, agradecer a mi grupo bioinformático, a Rocío B., por la paciencia en este mundo de código indescifrable en el que siempre me has guiado, y en el que cada paso que dábamos el triunfo era mutuo; a Luis, por ser un sol en los días grises y tener esa energía que te contagia a seguir mejorando y a Belén, compañera de despacho, de risas y lágrimas, donde tantos obstáculos hemos intentado superar juntas.

No puedo pasar sin expresar mi gratitud a Alex y Juan, mis anfitriones en Mallorca. La experiencia fue increíblemente enriquecedora, llena de conocimientos que jamás imaginé que la física podría brindarme, pero sobre todo, porque me permitió descubrir a unas personas maravillosas.

A mis amigos, quienes sé que estaréis leyendo estas líneas, quiero agradecerlos por ser mi sostén en la rutina diaria y apoyarme tanto en mi bienestar emocional.

Nada de esto sería posible sin el soporte de mi familia. A mis tios, por apoyarme y seguirme en cada paso que doy. A mi hermana Elena, por animarme a superar mis miedos y mostrar hacia mis logros esa gran admiración. A mi padre, por jamás cuestionar mi camino elegido y saber, que sin importar el rumbo que tome, será su mayor orgullo. Especialmente a mi madre, cuyo cariño le ha hecho aprender más biología de la que jamás hubiera imaginado; por leer y escuchar cada palabra que escribo, encontrar siempre los mejores consejos y ayudarme incondicionalmente. Y a mis abuelos, quienes han estado presentes en todos los pasos de mi vida, inculcándome los valores que hoy me definen, y que continuarán acompañándome en el corazón.

Por último, a mi compañero de vida Antonio, por ser la luz que ilumina mis días, capaz de transformar los agobios en risas. Por acompañarme en todas mis decisiones y recordarme siempre que, pase lo que pase, “nos tenemos el uno al otro”.

GRACIAS

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	3
1. La acuicultura	3
2. Desafíos en la industria acuícola.....	6
2.1. La alimentación.....	7
2.2. La salud de los peces.....	8
3. Dietas funcionales	10
3.1. Macroalgas y microalgas.....	11
3.2. Probióticos.....	13
4. La microbiota de los teleósteos.....	21
4.1. Funciones de la microbiota	22
4.2. Estrategias para el avance en el estudio de la microbiota	25
Referencias	27
 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
 CAPÍTULO 1. Efectos de una dieta suplementada con la microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> sobre la microbiota y expresión de genes implicados en la barrera intestinal de doradas	49
Resumen	49
1. Introducción.....	50
2. Material y métodos	52
2.1. Preparación del alimento	52
2.2. Diseño del experimento y muestreo	53
2.3. Extracción y secuenciación de ADN mediante tecnología Illumina Miseq	54
2.4. Perfil funcional de comunidades microbianas	56
2.5. Aislamiento de ARN y PCR cuantitativa (qPCR)	56
2.6. Declaración del comité de ética	57
2.7. Disponibilidad de datos	58
3. Resultados	58
3.1. Análisis de los datos de la secuenciación.....	58

3.2. Composición taxonómica de la microbiota intestinal	59
3.3. Estudio predictivo sobre la funcionalidad de la microbiota intestinal.....	67
3.4. Expresión génica.....	67
4. Discusión	72
Referencias	77
Material Suplementario.....	84

CAPÍTULO 2. Análisis de las interacciones de las comunidades microbianas presentes en la piel y branquias de *Sparus aurata* tras la administración de una dieta suplementada con *Nannochloropsis* sp. y *Arthrospira* sp.....

Resumen	87
1. Introducción.....	88
2. Material y métodos	90
2.1. Preparación del alimento	90
2.2. Diseño del experimento y muestreo	92
2.3. Extracción y secuenciación de ADN mediante tecnología Illumina Miseq	93
2.4. Análisis de redes complejas	94
2.5. Declaración del comité de ética.....	97
2.6. Disponibilidad de datos y material	97
3. Resultados	97
3.1. Análisis taxonómico de la composición de la microbiota.....	97
3.2. Análisis de redes de coocurrencia ASV	99
3.3. Análisis de comunidad	101
4. Discusión	106
Referencias	112
Material Suplementario.....	118

CAPÍTULO 3. Estudio del efecto sobre la microbiota y la respuesta transcriptómica de la piel dañada de *Sparus aurata* tras la administración de una dieta adicionada con el probiótico *Shewanella putrefaciens* SpPdp11.....

Resumen	125
1. Introducción.....	126

2. Material y métodos	128
2.1. Crecimiento bacteriano.....	128
2.2. Animales, diseño experimental y muestreo	128
2.3. Extracción de ADN y secuenciación del gen ADNr 16S de la microbiota asociada a la piel.....	130
2.4. Aislamiento de ARN, control de calidad y secuenciación.....	131
2.5. Análisis de expresión diferencial y enriquecimiento funcional.....	132
2.6. Correlación de microbiota y genes	132
2.7. Declaración del comité de ética	133
2.8. Disponibilidad de los datos	133
3. Resultados	133
3.1. Análisis de la microbiota cutánea	133
3.2. Secuenciación del transcriptoma de la piel y análisis de genes expresados diferencialmente (DEG).....	138
3.3. Análisis de los DEG con los cambios de expresión más pronunciados.....	140
3.4. Análisis de enriquecimiento del transcriptoma de <i>S. aurata</i> y de los genes expresados diferencialmente	140
3.5. Correlación entre la microbiota asociada al moco y los genes con mayor alteración en la piel de ejemplares de <i>S. aurata</i> con heridas	142
4. Discusión	143
Referencias	149
Material suplementario	157

CAPÍTULO 4. Análisis del efecto de la alimentación con una dieta suplementada con la macroalga *Ulva ohnoi* sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*.....

Resumen	161
1. Introducción.....	162
2. Material y métodos	164
2.1. Composición y preparación de la dieta.....	164
2.2. Mantenimiento de peces.....	166
2.3. Procedimientos de muestreo y análisis de secuencia.....	166
2.4. Cálculos y análisis estadísticos.....	168

2.5. Declaración del comité de ética	169
2.6. Declaración de disponibilidad de datos.....	169
3. Resultados	170
3.1. Crecimiento de los peces y descripción general de la secuenciación de la microbiota intestinal	170
3.2. Composición de la microbiota gastrointestinal de <i>S. senegalensis</i>	171
3.3. Modulación de la microbiota intestinal mediante una dieta conteniendo <i>U. ohnoi</i>	174
3.4. Función prevista de la microbiota gastrointestinal	176
4. Discusión	178
Referencias	183
Material suplementario	192

CAPÍTULO 5. Evaluación del efecto de la aplicación, como paraprobiótico, del probiótico *Shewanella putrefaciens* SpPdp11 sobre la microbiota y la respuesta transcriptómica intestinal de ejemplares de *Solea senegalensis*.....

Resumen	197
1. Introducción.....	198
2. Material y métodos	200
2.1. Cultivo del microorganismo probiótico y sonicación	200
2.2. Preparación del pienso, diseño experimental y recogida de muestras.....	201
2.3. Observaciones histológicas	202
2.4. Extracción, evaluación de la calidad y secuenciación del ARN.....	202
2.5. Extracción, evaluación de la calidad y secuenciación del gen ADNr 16S	203
2.6. Declaración del comité de ética	204
2.7. Declaración de disponibilidad de datos.....	204
3. Resultados	205
3.1. Examen histológico de la respuesta <i>in vivo</i>	205
3.2. Respuesta transcriptómica del intestino de <i>S. senegalensis</i>	207
4. Discusión	214
Referencias	223
Material suplementario	233

DISCUSIÓN GENERAL	237
1. Efecto de dietas funcionales con microorganismos para <i>Sparus aurata</i>	238
1.1. ¿Se ve afectada la microbiota asociada a las mucosas de dorada por la alimentación con dietas funcionales suplementadas con microalgas y bacterias?	238
1.2. ¿Las dietas funcionales ensayadas producen cambios en la integridad de las superficies mucosas?	242
2. Inclusión de <i>Ulva ohnoi</i> o SpPdp11 como paraprobiótico en dietas funcionales de <i>Solea senegalensis</i>	244
2.1. ¿Se ve alterada la microbiota intestinal del lenguado senegalés tras la alimentación con estas dietas funcionales?	244
2.2. ¿Modifica el tejido intestinal la inclusión de <i>U. ohnoi</i> o el paraprobiótico SpPdp11 en la dieta de <i>S. senegalensis</i> ?	248
Referencias	252
 CONCLUSIONES	 263
 ANEXOS	 265

ÍNDICE DE FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....1

Figura 1. Desarrollo de la producción acuática mundial (acuicultura más pesca) en el periodo 1951-2021 según la FAO (Fuente: APROMAR 2023) 4

Figura 2. Ejemplar de dorada (*Sparus aurata*).....5

Figura 3. Ejemplar de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*).....6

Figura 4. Esquema representativo sobre alguno de los principales mecanismos de acción de los probióticos y los beneficios que ofrece al hospedador.....16

Figura 5. Esquema sobre la comunicación entre la microbiota intestinal y los tejidos como el intestino, la piel, o las branquias.....24

CAPÍTULO 1. Efectos de una dieta suplementada con la microalga *Nannochloropsis gaditana* sobre la microbiota y expresión de genes implicados en la barrera intestinal de doradas 49

Figura 1. Curvas de rarefacción por individuo.....59

Figura 2. Comparación entre las comunidades microbianas a nivel de filo obtenidas para cada dieta.....60

Figura 3. Comparación entre las comunidades microbianas a nivel de familia obtenidas para cada dieta.....62-63

Figura 4. Comparación entre las comunidades microbianas a nivel de género obtenidas para cada dieta.....64-65

Figura 5. Análisis de coordenadas principales (PCoA).....66

Figura 6. Funciones inferidas por PICRUST a partir de la microbiota intestinal de *S. aurata*.....68-69

Figura 7. Representación por diagramas de caja de la expresión génica relativa en el intestino de dorada alimentada con la dieta experimental y el grupo control.....70-71

CAPÍTULO 2. Análisis de las interacciones de las comunidades microbianas presentes en la piel y branquias de *Sparus aurata* tras la administración de una dieta suplementada con *Nannochloropsis* sp. y *Arthrospira* sp.....87

Figura 1. Abundancia relativa a nivel de género en la microbiota (A) branquial y (B) cutánea de los peces.....99

Figura 2. Red de coocurrencia de ASV en branquias, calculada para los grupos de estudio (A) Control, (B) Cruda y (C) Hidrolizado por separado.....102

Figura 3. Red de coocurrencia de ASV en la piel, calculada para los grupos de estudio Control, Cruda y Hidrolizado por separado. 103

Figura 4. Gráfico ZiPi que muestra la distribución de ASV según sus funciones topológicas basadas en módulos para (A) branquias y (B) piel de la microbiota asociada con *Sparus aurata*.....105

CAPÍTULO 3. Estudio del efecto sobre la microbiota y la respuesta transcriptómica de la piel dañada de *Sparus aurata* tras la administración de una dieta adicionada con el probiótico *Shewanella putrefaciens* SpPdp11.....125

Figura 1. Diseño experimental. Las doradas fueron alimentadas durante 30 días con una dieta control o enriquecida con SpPdp11 10^9 UFC/g de dieta.....129

Figura 2. Abundancia relativa de bacterias a nivel de filo en la microbiota de la mucosa de la piel de peces alimentados con una dieta de control sin y con herida; así como los peces alimentados con la dieta probiótica sin y con herida.....134

Figura 3. Abundancia relativa de bacterias a nivel de clase (%) en la microbiota de la mucosa de la piel de peces alimentados con una dieta de control sin y con herida; así como los peces alimentados con la dieta probiótica sin y con herida.....135

Figura 4. Abundancia relativa de bacterias a nivel de género en la microbiota mucosa de la piel de peces alimentados con una dieta de control sin y con herida; así como los peces alimentados con la dieta probiótica sin y con herida..... 136

Figura 5. Diferencias significativas según *DESeq2* a nivel de género con abundancia relativa $> 0,5\%$ (*DESeq2*, $p < 0,05$) en la microbiota mucosa de la piel.....137

Figura 6. Análisis comparativo de la expresión génica.....139

Figura 7. Diagrama de puntos de las categorías funcionales enriquecidas en la categoría “funciones moleculares” de GO a partir de los DEG de la comparación CW vs. PW. 142

Figura 8. Red de correlaciones significativas (Spearman, $p < 0,05$ y $r < |0,9|$) entre los DEG con mayor tasa de cambio correlacionados con OTU en la comparación PW vs. CW.....143

CAPÍTULO 4. Análisis del efecto de la alimentación con una dieta suplementada con la macroalga *Ulva ohnoi* sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis* 161

Figura 1. Promedio de la abundancia relativa entre las muestras de microbiota intestinal a nivel de filo de *S. senegalensis* 172

Figura 2. Promedio de la abundancia relativa entre las muestras de microbiota intestinal a nivel de clase de *S. senegalensis* 172

Figura 3. Promedio de la abundancia relativa entre las muestras de microbiota intestinal a nivel de familia de <i>S. senegalensis</i>	173
Figura 4. Promedio de la abundancia relativa entre las muestras de microbiota intestinal a nivel de género de <i>S. senegalensis</i>	174
Figura 5. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la composición de la comunidad bacteriana a nivel de OTU según la matriz de distancias de Bray-Curtis. ...	175
Figura 6. Puntuaciones de LDA para los taxones diferencialmente abundantes en la microbiota del tracto intestinal de especímenes de <i>S. senegalensis</i>	176
Figura 7. Mapa de calor que muestra las diferencias significativas (ANOVA, F , $p < 0,05$) en la funcionalidad microbiana inferida (PICRUST) entre la microbiota intestinal posterior de <i>S. senegalensis</i>	177

CAPÍTULO 5. Evaluación del efecto de la aplicación, como paraprobiótico, del probiótico *Shewanella putrefaciens* SpPdp11 sobre la microbiota y la respuesta transcriptómica intestinal de ejemplares de *Solea senegalensis*.....

Figura 1. Vista a microscopía óptica del intestino anterior y intestino posterior de ejemplares de <i>S. senegalensis</i> alimentados con dietas CTRL y PDP11.....	206
Figura 2. Los diagramas de volcán ilustran las diferencias de expresión génica entre condiciones.....	208
Figura 3. Diagrama de puntos que ilustra los resultados del enriquecimiento funcional comparando <i>S. senegalensis</i> alimentado con la dieta control y con la suplementada con SpPdp11 sonicada en la sección intestinal anterior y posterior.	209
Figura 4. Gráfico NMDS de la composición de la comunidad bacteriana a nivel de ASV basado en la matriz de distancias de Bray-Curtis.....	210
Figura 5. Diagrama de barras de las abundancias relativas a nivel de filo por muestra del tracto gastrointestinal de <i>S. senegalensis</i> . Control y SpPdp11 suplementado en las secciones anteriores y posteriores.....	211
Figura 6. Comunidades bacterianas comunes en <i>S. senegalensis</i> alimentado con dieta de control y suplementada con el paraprobiótico sonicado (SpPdp11).	212
Figura 7. Las 10 diferencias más significativas identificadas por LEfSe a nivel de género.....	213
Figura 8. Rutas significativas de genes predichos utilizando PICRUST2 en el tracto digestivo de <i>S. senegalensis</i>	214

ÍNDICE DE TABLAS

I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
Tabla 1. Resumen de estudios destacados en la última década en los que se incorporaron microalgas/algas al pienso de <i>S. aurata</i>	14
Tabla 2. Resumen de estudios destacados en la última década en los que se incorporaron microalgas/algas al pienso de <i>S. senegalensis</i>	15
Tabla 3. Resumen de estudios destacados en la última década en los que se administraron bacterias probióticas al pienso de <i>S. aurata</i>	19
Tabla 4. Resumen de estudios destacados en la última década en los que se administraron bacterias probióticas al pienso de <i>S. senegalensis</i>	20
 CAPÍTULO 1. Efectos de una dieta suplementada con la microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> sobre la microbiota y expresión de genes implicados en la barrera intestinal de doradas	 49
Tabla 1. Composición de ingredientes de las dietas experimentales utilizadas en el ensayo de alimentación.	53
Tabla 2. Índices de diversidad alfa de comunidades bacterianas en las secciones intestinales anterior y posterior de <i>S. aurata</i> alimentadas con dietas control y <i>N. gaditana</i>	59
 CAPÍTULO 2. Análisis de las interacciones de las comunidades microbianas presentes en la piel y branquias de <i>Sparus aurata</i> tras la administración de una dieta suplementada con <i>Nannochloropsis</i> sp. y <i>Arthrospira</i> sp.	 87
Tabla 1. Composición de ingredientes de las dietas experimentales utilizadas en el ensayo de alimentación.	91
Tabla 2. Índices de diversidad de Shannon y Simpson de la microbiota asociada a branquias y piel en los tratamientos de estudio Control, Crudo e Hidrolizado.....	98
Tabla 3. Topología de las redes de ASV de la microbiota asociada a branquias y piel en cada una de las dietas ensayadas.	100
Tabla 4. Índice de Shannon de comunidades de redes por tratamiento y tejido	104
 CAPÍTULO 3. Estudio del efecto sobre la microbiota y la respuesta transcriptómica de la piel dañada de <i>Sparus aurata</i> tras la administración de una dieta adicionada con el probiótico <i>Shewanella putrefaciens</i> SpPdp11.....	 125
Tabla 1. Índices de diversidad alfa de la microbiota asociada a la mucosa cutánea de <i>S. aurata</i>	133

Tabla 2. Listado de los 20 genes significativamente más sobreexpresados (gris claro) y reprimidos (gris oscuro) en PW en comparación con CW.	141

CAPÍTULO 4. Análisis del efecto de la alimentación con una dieta suplementada con la macroalga *Ulva ohnoi* sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis* 161

Tabla 1. Composición de ingredientes de las dietas experimentales utilizadas en el ensayo de alimentación.	165

Tabla 2. Valores de crecimiento de los ejemplares juveniles de estudio de <i>S. senegalensis</i>	170

Tabla 3A. Diversidad alfa de comunidades bacterianas en secciones del tracto intestinal anterior de especímenes de <i>S. senegalensis</i>	171

Tabla 3B. Diversidad alfa de comunidades bacterianas en secciones del tracto intestinal posterior de especímenes de <i>S. senegalensis</i>	171

CAPÍTULO 5. Evaluación del efecto de la aplicación, como paraprobiótico, del probiótico *Shewanella putrefaciens* SpPdp11 sobre la microbiota y la respuesta transcriptómica intestinal de ejemplares de *Solea senegalensis*..... 197

Tabla 1. Resultados de los análisis morfométricos realizados en secciones de intestino anterior y posterior de ejemplares de <i>S. senegalensis</i> alimentados con dietas CTRL y PDP11.	207

Listado de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNr 16S	Ácido desoxirribonucleico ribosomal 16S
AGCC	Ácido graso de cadena corta
AIM2	Ausente en melanoma 2
ANOVA	Análisis de la varianza
APROMAR	Asociación empresarial de acuicultura de España
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASV	Variante de secuencia de amplicón (<i>amplicon sequence variant</i>)
BAL	Bacterias del ácido láctico
BH	Benjamini-Hochberg
bp	Pares de bases
BRD	Bromo dominio
Cq	Ciclo de cuantificación
DE	Desviación estándar
DEG	Genes expresados diferencialmente (<i>Differential expressed genes</i>)
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización
DHA	Ácido docosahexaenoico, 22:6n3
DO	Densidad óptica
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena doble
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE. UU.	Estados Unidos
EH	Altura de los enterocitos
EPA	Ácido eicosapentaenoico, 22:5n3
FAO	Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura
FBW	Peso corporal final
FC	Tasa de cambio (<i>Fold Change</i>)
FCR	Factor de conversión alimentaria
FDR	Tasa de falso descubrimiento (<i>False discovery rate</i>)
FPKM	Fragmentos por kilobase de exón por millón de lecturas mapeadas
FYBOA	Fotobiología y biología de organismos acuáticos
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
GC	Guanina y citosina
GIALT	Tejido linfoide asociado a las branquias
GO	Ontología de genes (<i>gene ontology</i>)
HS	Alta sensibilidad

HTS	Secuenciación masiva (<i>High-Throughput Sequencing</i>)
HUFA	Ácidos grasos altamente insaturados
IFAPA	Instituto de investigación y capacitación agraria y pesquera
KEGG	Enciclopedia de genes y genomas de Kioto
LDA	Análisis discriminante lineal
LP	Lámina propia
LPS	Lipopolisacárido
MALT	Tejido linfoide asociado a las mucosas
MU	Grosor de la capa muscular
NA	No asignado
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NGS	Secuenciación de nueva generación (<i>next generation sequencing</i>)
NMDS	Escalamiento multidimensional no métrico
NOD	Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
NSTI	Índice del taxón secuenciado más cercano (<i>Nearest Sequenced Taxon Index</i>)
OD	Densidad óptica
OTU	Unidad taxonómica operacional (<i>Operational Taxonomic Unit</i>)
PBS	Solución salina de tampón fosfato
PCB	Bifenilo policlorado
PCoA	Análisis de coordenadas principales
PERMANOVA	Análisis de varianza multivariado basado en permutaciones
PFP	Proteínas formadoras de poros
PPAR	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas
PRR	Receptores que reconocen patrones
Q20	Puntuación de calidad de 20
Q30	Puntuación de calidad de 30
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RIG-I	Gen inducible por ácido retinoico
RMS	Rendimiento máximo sostenible
RNA-seq	Secuenciación de ARN
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
SALT	Tejido linfoide asociado a la piel
SCI-MC	Servicios centrales de investigación de cultivos marinos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SE	Grosor de la capa serosa
SM	Grosor de la capa submucosa
SpPdp11	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11

SRA	Archivo de lecturas de secuencias (<i>Sequence Read Archive</i>)
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano clorhidrato
TSBs	Caldo de soja triptona con sal
UFC	Unidades formadoras de colonias
UniFrac	Fracción única
VD	Diámetro de las vellosidades
VH	Altura de las vellosidades
WGR	Tasa de aumento de peso

Nota previa

Durante el desarrollo de la presente Tesis doctoral se ha empleado la taxonomía bacteriana basada en las clasificaciones ampliamente aceptadas al inicio de esta investigación. Sin embargo, debido a que la taxonomía bacteriana es un campo en constante evolución, las denominaciones y clasificaciones utilizadas en esta tesis han sido actualizadas en la literatura más reciente.

A pesar de estas actualizaciones, en el presente trabajo mantiene el uso de la nomenclatura y clasificación taxonómica vigentes al momento de la realización de la misma, con el fin de asegurar la coherencia y consistencia con los datos y referencias utilizadas.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Resumen





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Resumen

El acceso a una alimentación adecuada es un desafío para gran parte de la población actual, a nivel mundial. En respuesta a esta demanda y con el objetivo de preservar los recursos naturales, la acuicultura se presenta como una solución clave. Su capacidad para proporcionar proteínas de manera accesible y asequible la ha convertido en la industria alimentaria de mayor crecimiento a nivel global.

Cada vez más pescados y mariscos consumidos provienen de la acuicultura, y en este contexto, España se destaca como líder en la Unión Europea debido a su importancia económica en el sector y la diversidad en especies cultivadas que alberga. En concreto, esta Tesis Doctoral aborda estudios en dorada (*Sparus aurata*), una de las especies de mayor consumo en Europa, y en lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), una especie que ha surgido en respuesta a la posible saturación del mercado de las especies ya establecidas y que actualmente reporta un buen beneficio económico.

Sin embargo, la industria acuícola se enfrenta a múltiples retos para compaginar su rápida expansión con la sostenibilidad ambiental. La alimentación de los animales es una de las principales tareas, ya que muchas especies cultivadas requieren dietas ricas en proteínas de alta calidad, tradicionalmente obtenidas de la harina de pescado. A su vez, las condiciones de cultivo intensivo pueden generar estrés y aumentar la susceptibilidad a enfermedades, favoreciendo la propagación de patógenos y ocasionando pérdidas económicas significativas. La saturación de recursos, así como la implementación de alimentos que aporten beneficios a la salud y el bienestar animal, ha impulsado a la búsqueda de compuestos alternativos que cumplan con los requerimientos nutricionales de las especies acuícolas.

En este sentido, las dietas funcionales han surgido como una alternativa prometedora, que no sólo busca satisfacer las necesidades básicas de los peces, sino también mejorar la calidad nutricional de la carne, fortalecer el sistema inmunitario y aumentar la resistencia al estrés y enfermedades. Entre los compuestos de interés en este ámbito se encuentran las algas y las bacterias.

Las algas, tanto macroalgas como microalgas, son ricas en ácidos grasos poliinsaturados como el omega-3, vitaminas, minerales y antioxidantes, convirtiéndolas en ingredientes valiosos en las dietas funcionales. Sin embargo,

es importante tener en cuenta que también pueden contener factores antinutricionales que afectan a la digestibilidad y biodisponibilidad de los nutrientes, por lo que se requieren estudios adicionales para determinar la forma de administración y dosis más adecuadas para su consumo. Por otro lado, las bacterias consideradas probióticas ofrecen beneficios adicionales al competir por los nutrientes y el espacio con las especies patógenas, producir sustancias inhibitorias y mejorar la calidad del agua. Además, se están explorando alternativas como el uso de células inactivadas (paraprobióticos), para afrontar la problemática de la viabilidad y el almacenamiento de bacterias vivas, ofreciendo de igual forma, beneficios significativos al organismo al que se les administra. Por todo ello, es crucial estudiar el impacto que pueden tener los cambios dietéticos en el animal, ya que pueden garantizar su seguridad y valor comercial.

Los componentes de la dieta interactúan directamente con el tracto digestivo, pudiendo provocar alteraciones en su estructura y función. De igual forma, los microorganismos que habitan de manera simbiótica en el intestino pueden verse modificados frente a la presencia de nuevos compuestos en la dieta. Esta microbiota intestinal desempeña funciones vitales para la salud del hospedador, participando en el metabolismo de nutrientes, producción de ácidos grasos de cadena corta, fermentación de compuestos no digeribles y síntesis de vitaminas y aminoácidos. También contribuye a la maduración epitelial y a la diferenciación celular, y posee un papel crucial en las defensas inmunitarias.

Dadas las múltiples funciones de la microbiota, se debe comprender cómo factores como la dieta tiene un impacto en su composición y si ello puede afectar al estado de salud del hospedador. Además, se debe considerar que los metabolitos generados en el intestino tienen la capacidad de circular a través del sistema circulatorio y modificar la fisiología de otros tejidos, como la piel o las branquias, que a su vez poseen una microbiota propia y son susceptibles a estas variaciones.

En esta Tesis Doctoral se avanza en el conocimiento molecular del impacto de las dietas funcionales que contienen algas y bacterias en la microbiota asociada a las mucosas y la respuesta a nivel transcripcional de los tejidos subyacentes de dos especies de interés acuícola, como son la dorada o el lenguado senegalés.

En el **Capítulo 1**, se estudió la administración de una dieta con baja inclusión de la microalga *Nannochloropsis gaditana* en juveniles de *S. aurata*. Esta alga que ha sido considerada por su capacidad de acumular ácidos grasos poliinsaturados, aminoácidos y antioxidantes, y ha demostrado efectos positivos cuando se ha

suplementado en la alimentación de peces carnívoros. Sin embargo, la administración de microalgas crudas puede causar inflamación intestinal y alterar la digestión y absorción de nutrientes en el hospedador. Se ha reportado que la hidrólisis de estos ingredientes presentan ventajas al aumentar la biodisponibilidad de proteínas y compuestos bioactivos esenciales para el desarrollo fisiológico en la acuicultura. Este estudio evaluó los efectos de una dieta con un 5% de *N. gaditana* hidrolizada durante 86 días en la microbiota intestinal y su potencial funcionalidad en dorada. Además, se estudiaron los cambios producidos en la barrera intestinal mediante el análisis de la expresión de genes relacionados con la permeabilidad del tejido. Los resultados mostraron que la composición bacteriana y la funcionalidad microbiana intestinal no se vieron afectadas significativamente por la inclusión de *N. gaditana* hidrolizada. En concordancia, la expresión de genes relacionados con la integridad intestinal tampoco mostró diferencias significativas entre tratamientos.

La inclusión de nuevos componentes en las dietas también puede alterar la fisiología y la composición de la microbiota de las mucosas del pez. En el **Capítulo 2** se analizaron los efectos de la suplementación con un 10% de una mezcla de microorganismos fotosintéticos (*Arthrospira* sp. y *Nannochloropsis* sp., en una proporción 70:30% respectivamente) en la dieta de adultos de *S. aurata* durante 41 días. En este estudio se evaluó si esta inclusión dietética provocaba modificaciones en la microbiota cutánea y branquial de dorada. Para ello, se realizó un análisis taxonómico mediante la secuenciación de amplicones de la región V3-V4 del gen ADNr 16S, identificándose variaciones de taxones poco abundantes entre los tratamientos. En busca de alteraciones del ecosistema microbiano que pueden pasar desapercibidas en un análisis taxonómico convencional, se profundizó en el estudio de redes de coocurrencia basadas en la abundancia diferencial entre las distintas ASV (Amplicon Sequence Variants) presentes. Se observó un patrón de redes modular en el que la microbiota de branquias poseía una estructura robusta, con una interacción entre ASV del género *Polaribacter* y *Acinetobacter* destacable, mientras que las redes en la piel eran más lineales y, por tanto, más susceptibles a modificaciones. Además, los patrones de coocurrencia se agruparon según la filogenia, asumiendo una equivalencia funcional entre taxones similares. Estos resultados destacan la importancia de entender las interacciones del ecosistema microbiano asociado a las mucosas, que podría tener implicaciones significativas como futuras dianas terapéuticas.

El **Capítulo 3** abordó el último estudio de esta Tesis Doctoral realizado en dorada, centrándose en la administración de una dieta probiótica. Se conocen diversos mecanismos a través de los cuales los probióticos ejercen efectos beneficiosos sobre la barrera cutánea, tales como su capacidad para fortalecerla y competir frente a patógenos. Debido a que las lesiones cutáneas son un fenómeno frecuente asociado a las condiciones intensivas que sufren los peces de cultivo, se estudió si el efecto de la incorporación de un probiótico en la dieta podría influenciar la cicatrización de heridas cutáneas. Para este estudio se suplementó la dieta con el probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11) durante 37 días. Se ha informado de numerosos efectos beneficiosos en dorada por parte del probiótico Spdp11, pero este estudio se centró en analizar el efecto del probiótico sobre la microbiota asociada al moco de la piel y la respuesta transcriptómica de este tejido ante un daño ejercido mecánicamente. Los ejemplares heridos que recibieron la dieta probiótica mostraron una disminución de microorganismos asociados a la formación de biopelículas, lo cual se relacionó con una menor inflamación del tejido dañado. También se produjo una represión de genes relacionados con la proliferación celular y la sobreexpresión de genes implicados en mecanismos de señalización, migración y diferenciación celular. Todo ello reflejaba que los animales que recibieron la dieta probiótica se encontraban en un proceso más avanzado de la curación de la herida que el grupo alimentado con la dieta control. Asimismo, se observó una correlación significativa entre distintos géneros como *Achromobacter*, *Fluviicola*, *Flavobacterium*, pertenecientes a la familia *Ruminococcaeae* o al filo Bacterioidetes, con genes relacionados con la migración y proliferación celular y la inflamación. Estas correlaciones sugieren que estos microorganismos podrían ser objeto de futuros estudios para comprender mejor su papel en la curación de heridas cutáneas en peces de cultivo.

En cuanto a los estudios realizados en el lenguado senegalés, se ha empleado una visión focalizada exclusivamente en la estructura intestinal, motivado por la escasez de investigaciones de esta índole en esta especie. Dichos estudios han comprendido, una vez más, el efecto de las algas y los probióticos en tracto gastrointestinal.

En el **Capítulo 4** se estudió el efecto de la inclusión de un 5% de *Ulva ohnoi* en la microbiota intestinal de *S. senegalensis* durante 90 días. Las especies de *Ulva* sp. son una buena fuente de proteínas, minerales y vitaminas y han reportado resultados positivos en el rendimientos del crecimiento, la respuesta de su

sistema inmunitario y el estado general de salud de los peces que la ingirieron. Por lo tanto, se propone como un ingrediente nutracéutico de fácil obtención, aunque en altas concentraciones se pueden obtener resultados desfavorables debido a sus componentes antinutricionales. Los resultados mostraron que la administración dietética de esta alga aumentaba significativamente la abundancia del género *Vibrio* y disminuía la de *Stenotrofomonas* en las muestras de microbiota de la sección posterior del intestino. Estos resultados estuvieron acompañados de modificaciones en la predicción de la funcionalidad, dónde los animales que recibieron la dieta experimental presentaron una microbiota con mayor abundancia de genes relacionados con la biodegradación y el metabolismo de xenobióticos, así como una disminución en los genes de biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas y resistencia a betalactámicos. Estos cambios pueden considerarse deseables para la microbiota de los peces, ya que contribuyen a la degradación de compuestos presentes en los alimentos de origen vegetal y a una menor presencia de resistencias a antibióticos.

Por último, el **Capítulo 5** aborda el estudio sobre la estabilidad del tracto gastrointestinal de *S. senegalensis* tras la incorporación a la dieta del probiótico SpPdp11 en forma de células inactivadas por sonicación (paraprobiótico). El experimento de alimentación se llevó a cabo durante un periodo de 45 días, y se realizaron análisis histológicos, transcriptómicos y de microbiota intestinal. Los análisis histológicos revelaron la estabilidad del intestino, con una disminución significativa en el espesor de la lámina propia. Los análisis transcriptómicos mostraron la sobreexpresión de genes involucrados en la síntesis primaria de ácidos biliares y la supresión de la expresión de genes en la ruta de interacción del receptor de la matriz extracelular (ECM), así como con la alteración de la ruta de señalización del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR). Además, la microbiota intestinal mostró una clara diferenciación entre los individuos que recibieron la dieta con el paraprobiótico y el grupo control, evidenciándose una disminución del filo *Proteobacteria* y un aumento del filo *Firmicutes*. Estos resultados sugieren un estado saludable del tracto intestinal, con una tendencia hacia propiedades antiinflamatorias, destacando el potencial beneficioso del paraprobiótico SpPdp11 en la alimentación de *S. senegalensis*.

En resumen, los estudios realizados en esta Tesis Doctoral demuestran que la inclusión de componentes funcionales como algas y bacterias en la dieta de especies de interés en la acuicultura, tales como *S. aurata* y *S. senegalensis*, puede mejorar la salud y el rendimiento de estos animales. La modulación de la

microbiota intestinal, cutánea y branquial, señala la importancia de la interacción entre la nutrición y la microbiota en el bienestar de los peces, así como la capacidad de resiliencia que poseen estos ecosistemas microbianos para mantener su función en el organismo. Además, las respuestas transcriptómicas observadas proporcionan una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares subyacentes a estos efectos beneficiosos. Esta información amplía el conocimiento sobre la interacción microbiota-hospedador en peces de cultivo, y ofrece nociones valiosas para el diseño de futuras dietas funcionales optimizadas en la acuicultura.

Introducción general





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Introducción general

1. La acuicultura

En la actualidad, más de 2 300 millones de personas tienen acceso limitado a una alimentación adecuada (FAO, 2023b). Existe un firme desafío para satisfacer las necesidades de una población en constante crecimiento sin agotar los recursos naturales. Por consiguiente, los sistemas alimentarios basados en recursos acuáticos han ganado relevancia por su capacidad para abastecer de manera sustancial las necesidades alimentarias de la humanidad, ya que son fuentes de proteínas animales y micronutrientes de fácil acceso y asequibles (Naciones Unidas sobre nutrición, 2021). La acuicultura se entiende como una práctica de crianza y cultivo de organismos acuáticos que abarca desde peces y crustáceos, hasta moluscos y algas, llevada a cabo en condiciones controladas y destaca como la industria alimentaria de más rápido crecimiento en el mundo (Naylor y col., 2021).

Desde 1961, el consumo mundial de alimentos acuáticos ha experimentado un crecimiento constante, con una tasa promedio anual del 3 % (FAO, 2023a). Considerando las limitaciones de crecimiento en el sector de la pesca, resulta crucial promover un aumento en la producción acuícola para satisfacer las necesidades globales, especialmente en aquellos países en los que el consumo de animales acuáticos de criadero ha llegado a superar al de la pesca salvaje (Boyd y col., 2022). En 2021 la producción mundial de animales acuáticos alcanzó aproximadamente 218 millones de toneladas según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). De esta cifra total, la pesca extractiva contribuyó con 92 millones de toneladas, representando el 42,3 %, mientras que la acuicultura aportó el 57,4 % restante (Figura 1). Esta diferencia se atribuye al hecho de que el sector de la pesca extractiva sostenible ha alcanzado su rendimiento máximo sostenible (RMS) y ha mantenido un volumen estabilizado durante casi 30 años, oscilando entre 80 y 90 millones de toneladas.

Según los datos del informe APROMAR (2023), España lideró la producción de acuicultura entre los Estados miembros de la Unión Europea (UE), cosechando un total de 271 060 toneladas, lo que representó el 23,7% del total de la UE, en el año 2021. Le siguieron Francia con 198 886 toneladas (17,4%), Italia con 145 862

toneladas (12,8%), Grecia con 143 926 toneladas (12,6%) y Polonia con 44 787 toneladas (3,9%).

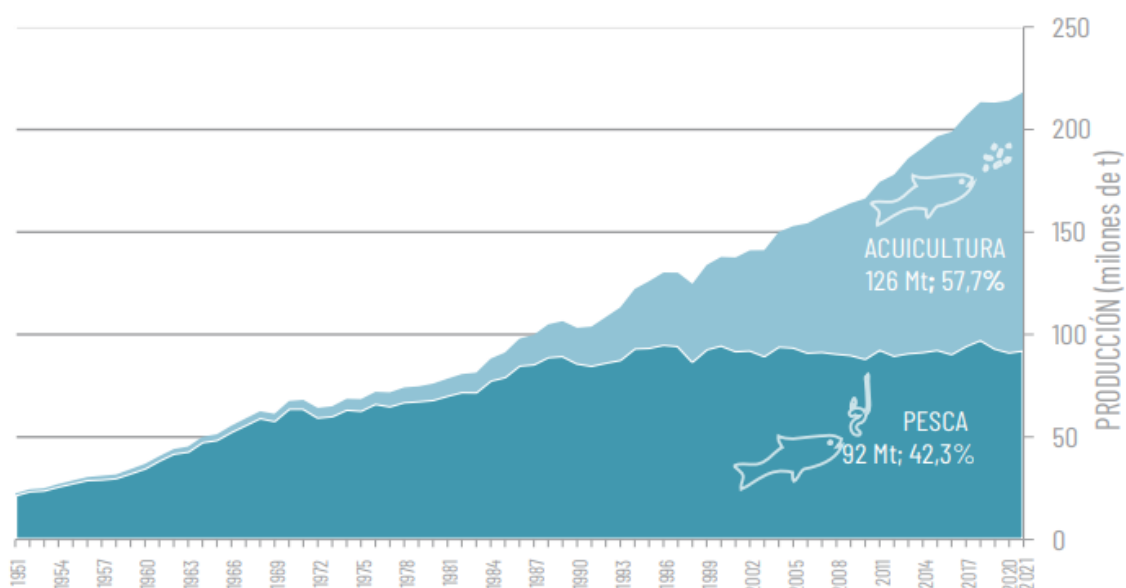


Figura 1. Desarrollo de la producción acuática mundial (acuicultura más pesca) en el periodo 1951-2021 según la FAO (Fuente: APROMAR 2023).

España se caracteriza por ser uno de los países con mayor diversidad acuícola, cultivando alrededor de 40 especies, tanto marinas como de agua dulce. En el año 2021, la producción de acuicultura en España alcanzó un valor en la venta primaria de 526,5 millones de euros. Se trata de una industria fundamental en el impulso de la economía local del país, reflejo tanto la riqueza de las costas como de la creciente demanda del mercado.

En el marco de esta tesis doctoral, se abordan estudios sobre dos importantes especies en la acuicultura española, la dorada (*Sparus aurata*) y el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*).

El cultivo de la dorada (Figura 2) representa la mayor parte de la producción en el Mediterráneo, y cerca del 95% del consumo actual proviene de instalaciones de piscicultura (Theodorou y col., 2015). En España la producción de dorada fue de 8 932 toneladas en el año 2022, con un valor económico que ascendió a 43,7 millones de euros, siendo la Comunidad Valenciana la que encabezó la producción con 5 620 toneladas (63 % del total), seguida por la Región de Murcia con 1 327 toneladas (15 %), Andalucía con 815 toneladas (9 %), Canarias con 790 toneladas (9 %) y Cataluña con 380 toneladas (4 %) (APROMAR 2023).

En la actualidad la cría y reproducción se puede realizar por completo en cautividad, y su comercialización se alcanza a partir del año y medio de edad, con un tamaño que varía entre 250 g a 2 kg. Se trata de una especie carnívora, que de forma salvaje, se alimenta principalmente de crustáceos, peces y, especialmente, bivalvos. Sin embargo, en cautiverio, las larvas se alimentan primero de rotíferos, artemias, y posteriormente de piensos comerciales (Moretti y col., 2005).



Figura 2. Ejemplar de dorada (*Sparus aurata*).

Por otra parte, el interés de las empresas acuícolas por diversificar sus especies ante la saturación potencial del mercado de las ya establecidas, llevó a apostar por el cultivo del lenguado senegalés (Figura 3) en España a partir de la década de los 90 (Cañavate, 2005).

La producción del lenguado senegalés en España alcanzó las 1 752 toneladas en 2021, reflejando un incremento del 19,9 % en comparación con el año anterior. Esta producción se distribuyó mayoritariamente en Galicia (70 %) y Andalucía (30 %). En términos de valor, el lenguado ocupa una posición destacada en los mercados, siendo altamente apreciado, lo que ha atraído la atención de inversores interesados en liderar su producción. Se estima que el precio en primera venta se sitúa en 16,7 euros por kilogramo, generando un valor total de 20,4 millones de euros en el año 2022 (APROMAR 2023).

El lenguado senegalés muestra un patrón de alimentación nocturno (Gillannejad y col., 2021; Navarro-Guillén y col., 2017). A diferencia de otras especies de peces planos, el lenguado senegalés tiene un estricto comportamiento de alimentación en el fondo, donde, de forma natural, obtendría una dieta omnívora de baja diversidad, con preferencia en bivalvos, poliquetos y crustáceos (Morais y col., 2016).



Figura 3. Ejemplar de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*).

El cultivo del lenguado senegalés aún demanda investigaciones en el ámbito de la nutrición, necesitando un mayor desarrollo en dietas específicas y adecuadas para cada fase de su crecimiento. Una dieta deficiente puede dar lugar a diversas alteraciones fisiológicas y problemas tales como las malformaciones esqueléticas o decoloración durante la fase larvaria, crecimiento insuficiente durante la fase de engorde, baja eficiencia reproductiva, supresión del sistema inmunitario y la aparición de patologías durante las etapas de preengorde y engorde (Boglione y col., 2013; de Azevedo y col., 2021; Fatsini y col., 2020).

2. Desafíos en la industria acuícola

Esta creciente demanda de productos pesqueros y acuícolas, impulsada por el crecimiento de la población y los cambios en los hábitos de consumo, ha ejercido una fuerte influencia sobre el medio ambiente (Ottinger y col., 2016). Aunque la acuicultura se presenta como una solución viable para satisfacer la creciente y constante demanda de alimentos, al tiempo que alivia la presión sobre las poblaciones de peces destinados a la pesca, existe un desafío constante en lograr un equilibrio sostenible entre la producción y la conservación de los recursos naturales.

Desde finales de los 80, ya se planteaba la necesidad de que la industria acuícola pueda ser considerada sostenible, garantizando la producción de alimentos saludables que satisfagan las necesidades del presente, sin comprometer el bienestar de las generaciones futuras (Keeble, 1988). La FAO, entidad líder en la promoción de la seguridad alimentaria y el desarrollo agrícola, aprobó en febrero de 2021 la “Declaración en favor de la pesca y la acuicultura sostenible” con el objetivo de una “transformación azul”. Este documento establece una serie de

medidas orientadas hacia el futuro, con el objetivo de cumplir los compromisos establecidos en la Agenda 2030. Entre los compromisos esenciales para lograr un enfoque sostenible, se incluye la eficiente utilización de recursos como la energía, el agua, la tierra, los piensos y los fertilizantes (Bosma y Verdegem, 2011). Sin embargo, a pesar de estos esfuerzos, la acuicultura sigue enfrentándose a numerosos desafíos, siendo la alimentación y la salud de los peces dos áreas problemáticas de particular relevancia.

2.1. La alimentación

Es fundamental reconocer que, en la acuicultura, gran parte de las especies que generan mayor aceptación en los consumidores, son de alimentación carnívora (FAO, 2023a). Para la cría de estas especies es necesario asegurar una dieta adecuada y nutritiva que promueva su desarrollo óptimo, lo que implica a menudo la utilización de recursos marinos para obtener harina de pescado, un ingrediente esencial en sus dietas (Tacon y Metian, 2015).

La harina de pescado es un componente altamente apreciado en la nutrición de los peces por su riqueza en proteínas, facilidad de digestión y palatabilidad. Además, proporciona una fuente equilibrada de aminoácidos esenciales, fosfolípidos y ácidos grasos omega-3, como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (Hua y col., 2019). Sin embargo, estas harinas se obtienen a través de la captura y procesamiento de peces salvajes, principalmente especies ricas en aceite y proteínas, como el arenque, la sardina y el boquerón (Ahmad y Ibrahim, 2016). El uso indiscriminado de harinas de pescado ha sido motivo de un dilema de sostenibilidad, pues implica la utilización de peces como fuente de alimento para otros peces (Ahmad y Ibrahim, 2016).

Ante esta problemática, se ha buscado diversificar las fuentes de ingredientes para la alimentación de peces, explorando otras opciones de origen animal, vegetal, algal y microbiano que proporcionan un contenido variable de proteína y grasa. A pesar de estos avances, se ha observado que alternativas, como las vegetales, no siempre proporcionan todos los nutrientes requeridos para el óptimo crecimiento y salud de los peces (Samtiya y col., 2020).

Por tanto, existe una compleja situación derivada de la disminución global en la disponibilidad de ingredientes marinos de alta calidad para la alimentación acuícola. Las formulaciones dietéticas se ven limitadas por la falta de información sobre las necesidades nutricionales específicas de las diferentes especies (Dawood y col., 2018; Hamre y col., 2013), lo que puede resultar en deficiencias

nutricionales que comprometen la inmunidad y aumentan el riesgo de enfermedades infecciosas en los animales (Dawood y col., 2018). La deficiencia de un solo nutriente, como vitaminas, minerales u oligoelementos específicos, puede tener efectos perjudiciales sobre la salud de los peces (Craig y col., 2017; Jiang y col., 2019; Lall y Kaushik, 2021).

2.2. La salud de los peces

Los peces cultivados están expuestos a cambios, tanto en la alimentación, como en las condiciones del agua (la calidad del agua, los niveles de oxígeno y la temperatura), que pueden afectar su salud y desencadenar respuestas de estrés (Kent, 2000).

La densidad de individuos en los criaderos y jaulas de cultivo intensivo puede ser alta, dando lugar a una mayor competencia por los recursos y un mayor estrés fisiológico. Estas densidades de población en los entornos acuícolas suelen ser muy superiores a las que se encontrarían en entornos naturales, lo que proporciona unas condiciones excelentes para que prosperen los patógenos (Krkošek, 2010; Salama y Murray, 2011). Además, otra de las razones de la susceptibilidad de las poblaciones acuícolas a infecciones, es su baja diversidad genética, lo que puede incrementar la virulencia de los patógenos (Kennedy y col., 2016). Estas condiciones proporcionan un entorno propicio para la propagación de infecciones bacterianas oportunistas (Kholil y col., 2015; Manchanayake y col., 2023), siendo una de las principales causas de pérdidas económicas en el sector acuícola, problema denominado en la industria como "crisis mundial de las enfermedades de la acuicultura" (Stentiford y col., 2017). Además, se incrementan los costes de medidas de control y tratamiento como medicamentos, mano de obra y tiempo dedicado a la gestión de la situación (Assefa y Abunna, 2018). A escala mundial, se estima que la pérdida total en el sector de la acuicultura es de más de 6 000 millones de dólares al año (Maldonado-Miranda y col., 2022). Ejemplos de ello, son las infecciones por patógenos como *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* y *Flavobacterium columnare*, que afectaron a la producción de bagre (*Bagre marinus*) en Estados Unidos, con costes de 10 millones de dólares (Peterman y Posadas, 2019); o en el caso de *F. columnare*, provocó brotes en diversas especies de peces en Chile, con pérdidas económicas anuales de entre 40 a 50 millones dólares (Flores-Kossack y col., 2020). Asimismo, en especies como la dorada y el lenguado senegalés, se han identificado numerosos patógenos que contribuyen significativamente a estas

pérdidas, como son *Vibrio anguillarum* y *V. ordalii* en dorada, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en el lenguado, o *V. harveyi* en ambas especies (Mohamad y col., 2019).

Una infección también puede ocasionar un crecimiento más lento y una disminución de la capacidad para convertir el alimento en carne de calidad, reflejándose en una reducción en el peso final de los peces y, por lo tanto, en una disminución en el valor y la cantidad de producto comercializable (Abdelrahman y col., 2023). Los consumidores tienden a evitar la compra del producto si observan daños superficiales, lo que resulta en un aumento de los costes de procesamiento y, por tanto, en una disminución del valor neto de los productos acuícolas (Lafferty y col., 2015).

Con el objetivo de garantizar la salud y la viabilidad de los animales en las explotaciones acuícolas, se implementan tratamientos que incluyen pesticidas y antibióticos en sus poblaciones. Sin embargo, esta práctica conlleva riesgos potenciales para el entorno y los consumidores, como la posible presencia de residuos antibióticos en los productos acuícolas, que puede tener consecuencias significativas para la seguridad alimentaria y contribuir a la aparición de resistencias antimicrobianas en la salud pública (Hossain y col., 2022; Schar y col., 2020)

Además de los antibióticos, la vacunación es una herramienta alternativa en la prevención de enfermedades, ya que puede ofrecer una protección específica y duradera contra ciertos patógenos, reduciendo así la necesidad de usar tratamientos químicos y el riesgo del desarrollo de resistencias antimicrobianas, además de proteger a los animales no vacunados mediante la inmunidad colectiva (Assefa y Abunna, 2018). No obstante, la implementación de programas de vacunación presenta desafíos, como los altos costos de desarrollo y aplicación, la necesidad de aplicar múltiples dosis para algunas enfermedades y la variabilidad en la eficacia según la especie y el patógeno (Adams, 2019). Los métodos más comunes de vacunación en peces incluyen la inmersión, la vacunación oral y la inyección intramuscular o intraperitoneal, siendo esta última la que mejores resultados alcanza, al inyectar una dosis uniforme a todos animales (Mondal y Thomas, 2022). Sin embargo, este método requiere manejar individualmente a cada pez, lo que puede causar estrés, reducir su consumo de alimento y provocar lesiones; y se necesitan peces de un tamaño adecuado, excluyendo así a los alevines jóvenes (Lieke y col., 2020).

Además, las explotaciones acuícolas necesitan realizar inversiones adecuadas en sus instalaciones, estableciendo estrategias efectivas de prevención y tratamiento de enfermedades (Ma y col., 2020). Se han implementado otras medidas, como la optimización de la calidad y desinfección del agua, el monitoreo regular de las condiciones de cultivo o la cría selectiva para aumentar la resistencia a enfermedades (Piazzon y col., 2020). Además, se ha enfocado en el diseño y optimización de instalaciones acuícolas, incorporando estructuras y refugios en los tanques y utilizando sistemas de recirculación del agua para crear un entorno más estable y saludable (Arechavala-Lopez y col., 2022).

La nutrición, por otro lado, también juega un papel esencial en este aspecto. Investigaciones recientes se han centrado en el desarrollo de dietas óptimas y equilibradas, diseñadas específicamente para las necesidades nutricionales de peces y moluscos de cultivo. Estas dietas buscan mejorar la eficiencia alimentaria, fortalecer el sistema inmunitario y aumentar la resistencia a enfermedades, lo que en última instancia contribuye a una producción acuícola más sostenible y rentable.

3. Dietas funcionales

Actualmente se estudian los requerimientos nutricionales de diferentes especies, y se intentan formular alimentos específicos para satisfacer esas necesidades (Colombo y col., 2022; Radhakrishnan y col., 2020; Zhang y col., 2020). Ello ha llevado a la industria acuícola a realizar esfuerzos significativos para mejorar los ingredientes empleados en las dietas de peces criados en cautiverio. Las dietas funcionales se caracterizan por incluir componentes específicos y aditivos que aportan beneficios complementarios a la nutrición. No obstante, la implementación de los principios nutricionales y aditivos funcionales en la acuicultura requiere un compromiso sólido en cuanto a la seguridad alimentaria y los objetivos de sostenibilidad.

Cuando se busca evaluar los cambios derivados de la incorporación de nuevos ingredientes en la dieta de los peces, se emplea una serie de análisis fisiológicos con el fin de obtener una comprensión de la salud y estado nutricional de los peces. Estos abarcan desde el pesaje y la evaluación de la calidad del filete (Grigorakis, 2017; Gümüş y Balaban, 2010), hasta análisis hormonales, de metabolitos o de tejidos, para proporcionar información del estado funcional de los órganos (Sadoul y Geffroy, 2019). También, para una comprensión de las

alteraciones inmunológicas, se recurre a técnicas serológicas, de citometría o la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) con el fin de cuantificar los distintos componentes del sistema inmunitario o la expresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria (Wang y col., 2015; Xu y col., 2017).

Los análisis fisiológicos tradicionales dan una visión general de los efectos de las alteraciones nutricionales en los peces. Sin embargo, en la acuicultura moderna, se reconoce cada vez más el valor de los enfoques “-ómicos”. El avance y la creciente disponibilidad de recursos que ofrecen las plataformas de secuenciación de nueva generación (NGS), genera un gran volumen de datos, proporcionando información a mayor escala que la obtenida mediante tecnologías tradicionales (Tripathy y col., 2022) y generando avances significativos para el sector acuícola sobre la alteración de la dieta en el individuo (Tripathy y col., 2022). Técnicas como la secuenciación masiva de ARN (RNA-seq) o el estudio del microbioma asociado a las mucosas, brinda información sobre los procesos biológicos y las vías metabólicas que se pueden ver afectadas por las dietas funcionales en base a los ingredientes que incluyan y, pueden servir para establecer estrategias de alimentación más efectivas y personalizadas que optimicen el crecimiento, la salud y el bienestar animal (Dhanasiri y col., 2020; Petit y col., 2019; Zhang y col., 2023).

3.1. Macroalgas y microalgas

Las algas y microalgas han sido consideradas fuentes de compuestos bioactivos que pueden mejorar la salud y el rendimiento de los peces en diferentes aspectos funcionales. Su principal beneficio es el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados omega-3, especialmente EPA y DHA (Wan y col., 2019; Wells y col., 2016). Estos ácidos grasos son esenciales para el crecimiento, desarrollo y función del sistema nervioso y los órganos sensoriales en los peces. La incorporación de algas ricas en omega-3 a la alimentación de los peces puede mejorar la calidad nutricional de su carne, incrementando los niveles de estos ácidos grasos beneficiosos para la salud humana. Las algas y microalgas contienen igualmente, una variedad de vitaminas, minerales y antioxidantes (Guedes y col., 2015).

También se ha demostrado, que la incorporación de estos compuestos como aditivos o suplementos en las dietas para peces de cultivo en condiciones controladas ha mejorado la salud del animal. Por ejemplo, estimula el sistema inmunitario, posee capacidad antiviral y antimicrobiana, mejora la función

intestinal, la resistencia al estrés, contribuye a una mayor resistencia frente a enfermedades y capacidad de recuperación del animal (Cyrus y col., 2015; Siddik y col., 2024).

Las microalgas también pueden ser utilizadas como fuente de alimento vivo en la etapa larval de muchos peces. Las larvas de muchas especies piscícolas tienen requerimientos dietéticos específicos y las algas microscópicas son una fuente natural de nutrientes que pueden proporcionar el alimento adecuado para su desarrollo temprano. El suministro de algas vivas durante esta etapa crítica puede mejorar la tasa de supervivencia y el crecimiento de las larvas, sentando las bases para una producción de pescado exitosa (Siddik y col., 2024).

Otro aspecto funcional en el que las algas pueden ser beneficiosas es en la coloración (Ju y col., 2011). Poseen numerosos tipos de pigmentos, como carotenoides, ficobiliproteínas y clorofilas (Cai y col., 2015; Manirafasha y col., 2016; Safafar y col., 2016). El betacaroteno es uno de los principales carotenoides producidos por las microalgas y se utiliza como provitamina A (retinol) en los piensos para acuicultura (Yaakob y col., 2014). Algunas especies de microalgas, como las del género *Nannochloropsis* sp., son conocidas por producir pigmentos como astaxantina, zeaxantina y cantaxantina (Abidin y col., 2021).

Por otro lado, debe tenerse en cuenta que, tanto algas como microalgas, contienen factores antinutricionales como lectinas, inhibidores de proteasas, bociógenos, alérgenos, antivitaminas, saponinas, taninos, fitatos, entre otros, que pueden interferir con la digestibilidad y biodisponibilidad de los nutrientes (Diken y col., 2016; Silva y col., 2015; Vizcaíno y col., 2019). Por ello, la adición de este tipo de compuestos debe ser rigurosamente analizada, haciendo énfasis en la dosis máxima beneficiosa para el organismo diana. En algunos casos, se han implementado estrategias de hidrólisis enzimática con el fin de debilitar la pared celular de estos organismos. Esta técnica mejora la liberación de componentes intracelulares, como péptidos bioactivos de bajo peso molecular y aminoácidos libres, aumentando la biodisponibilidad de nutrientes y potenciando las propiedades funcionales de estos aditivos en la alimentación de los peces (Bongiorno y col., 2022; Vizcaíno y col., 2018).

En los últimos años se ha producido un aumento significativo de la investigación centrada en la utilización de microalgas para la formulación de alimentos acuícolas, lo que refleja el creciente interés y la ampliación de los conocimientos en este campo. Las Tablas 1 y 2 recopilan algunos estudios desarrollados en la última década que se centran en la utilización de diferentes especies de algas y

microalgas como posibles ingredientes de dietas funcionales para la cría de dorada y lenguado, examinando sus principales efectos sobre el organismo.

3.2. Probióticos

La primera aplicación de los probióticos en organismos que viven en el agua se realizó en 1986 para comprobar si poseían capacidad de aumentar el crecimiento de los animales (Kozasa, 1986). A partir de entonces, se ha examinado una gran variedad de probióticos para su uso en acuicultura, abarcando bacterias Gram negativas y Gram positivas, bacteriófagos, levaduras y algas unicelulares (Akhter y col., 2015; Irianto y Austin, 2002; Sorroza y col., 2009); y se ha sugerido como un método de prevención a enfermedades respetuoso con el medio ambiente (Wang y col., 2008).

El término "probiótico" procede del griego *pro* y *bios* que significa "en favor de la vida" (Schrezenmeir y De Vrese, 2001). Según la definición de Merrifield y col., (2010) un probiótico en el ámbito de la acuicultura es un microorganismo proporcionado a través de la dieta o del agua de cría, que beneficia al hospedador, lo cual se logra, al menos en parte, mejorando el equilibrio microbiano de los peces. Los probióticos poseen diferentes mecanismos de acción que les permiten interferir en la colonización de bacterias patógenas como son la competición por el nicho, por los nutrientes, la producción de sustancias inhibitorias, la mejora de la calidad del agua o interaccionando con la comunicación *quorum sensing* (QS) (Figura 4).

Tabla 1. Resumen de estudios destacados en la última década en los que se incorporaron microalgas/algas al pienso de *S. aurata*

Especie de alga/microalga	% RHP	Tiempo de inclusión	Efecto con respecto a la dieta control	Referencias
<i>Chondrus crispus</i>	5%	15 días	Disminución del crecimiento, la concentración de lípidos, ácidos grasos omega-3 y de la glucosa en sangre. Aumento de ácidos grasos monoinsaturados y peroxidación hepática.	Guerreiro y col., 2019
<i>Ulva lactuca</i>			Aumento de ácidos grasos saturados y peroxidación hepática, disminución de ácidos grasos poliinsaturados y glucosa en sangre.	
<i>U. ohnoi</i>	5%	67 días, 28 días en el caso del desafío	No afectó a la digestión de proteínas, no tuvo efectos negativos en el crecimiento y la eficiencia alimenticia de la dorada, y el pretratamiento enzimático no mejoró su valor nutricional. Efecto inmunoestimulante.	Martínez-Antequera y col., 2021
<i>U. rigida</i>	25%	30 días	Mayor resistencia ante el patógeno <i>Photobacterium dampselae</i> susp. <i>piscicida</i> . Modificación de los géneros bacterianos predominantes de los peces en la microbiota intestinal hacia el género <i>Lactobacillus</i> .	Abdala-Díaz y col., 2021
		70 días	Los peces alimentados con un 25% de <i>Ulva</i> mostraron un contenido en lípidos significativamente menor al control.	Vizcaíno y col., 2016
<i>Gracilaria cornea</i>	15%		Los metabolitos no mostraron diferencias, excepto la glucosa plasmática y el lactato muscular. La actividad proteolítica intestinal se redujo.	
<i>Gracilaria gracilis</i>	0.15% y 0.35%	52 días. Infectados posteriormente durante 14 días	Mejóro el crecimiento y el perfil hematológico. No comprometió la salud hepática e intestinal. Produjo una supervivencia del 95% frente al patógeno <i>P. damsela subsp. piscicida</i>	Passos y col., 2021
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	12%, 20%, 25%, 39%	45 días	No afecto a la composición del musculo. Los individuos alimentados al 12% de <i>S. almeriensis</i> mostraron un mayor nivel de tripsina. Al 20%, aumentaron significativamente la capacidad de absorción de la mucosa intestinal.	Vizcaíno y col., 2014

RHP: Reemplazo de harina de pescado

Tabla 2. Resumen de estudios destacados en la última década en los que se incorporaron microalgas/algas al pienso de *S. senegalensis*

Especie de alga/microalga	% RHP	Tiempo de inclusión	Efecto con respecto a la dieta control	Referencias
<i>Chlorella vulgaris</i>	3%	A los 9 días, estado inmunitario y oxidativo. A los 20 días medidas de longitud, peso y la supervivencia	No altera la supervivencia, y estado inmunológico. Aumento del tamaño.	Peixoto y col., 2021
<i>Nannochloropsis gaditana</i>			Disminución del contenido total de glutatión en comparación a la dieta control. No altera la supervivencia, longitud total o estado inmune. Aumento del tamaño.	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>			No altera la supervivencia ni el estado inmune. Disminución del de tamaño. Disminución del contenido total de glutatión en comparación a la dieta control.	
	Cruda 5%, hidrolizada 5 y 10%	28 días	Sin diferencias en el crecimiento con <i>P. tricornutum</i> al 5%, pero se observó un aumento en la peroxidación lipídica. Aumento del peso seco al alimentarse con el 10% de algas hidrolizadas.	Barreto y col., 2021
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	15%	85 días	Buen rendimiento en términos de crecimiento y utilización de nutrientes.	Vizcaíno y col., 2018
<i>Tisochrysis lutea</i>			Buen rendimiento de crecimiento y utilización de nutrientes en comparación con la dieta comercial, pero sin variación de peso.	
<i>N. gaditana</i>			Se observó una mayor actividad de leucina aminopeptidasa. Se observó un buen rendimiento de crecimiento y utilización de nutrientes. Impacto positivo en la absorción intestinal, con valores más altos para la longitud de microvellosidades y la superficie de absorción de microvellosidades.	
<i>U. rigida</i>	10%	9 meses	No afectó al crecimiento de los peces ni la utilización de nutrientes.	Moutinho y col., 2018
<i>Undaria pinnatifida</i>			Redujo el peso en la fase de crecimiento, pero aumentó el contenido de yodo por filete.	

RHP: Reemplazo de harina de pescado



Figura 4. Esquema representativo sobre alguno de los principales mecanismos de acción de los probióticos y los beneficios que ofrece al hospedador (Elaboración propia generada con Biorender).

El mecanismo de competencia por espacios y nutrientes es una de las principales formas en que los probióticos pueden ejercer su acción (Chabrillón y col., 2005). En el tracto gastrointestinal, como en cualquier nicho ecológico, existe una competencia constante por el espacio y los nutrientes del entorno (Lazado y col., 2011). Si la ingesta de probióticos es adecuada, éstos colonizarán el intestino y ocuparán sitios de unión en la mucosa, evitando que los patógenos se adhieran a las células intestinales y utilizando así los nutrientes que necesitarían las bacterias patógenas para su supervivencia (Lazado y col., 2015). Los probióticos también son capaces de producir y liberar sustancias que tienen efecto sobre otros microorganismos, como son el ácido acético, ácido láctico, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, lisozimas o proteasas (El-Saadony y col., 2021; Tinh y col., 2008).

En relación con la calidad del agua de cultivo, se ha observado que bacterias Gram positivas, especialmente del género *Bacillus*, son eficientes en convertir materia orgánica en CO₂ o biomasa bacteriana, lo que ayuda a controlar la acumulación de carbono orgánico en los tanques (Mohapatra y col., 2013). Además, las bacterias probióticas nitrificantes mejoran la calidad del agua al aumentar la diversidad microbiana y eliminar la toxicidad del amoníaco y los nitratos (Zorriehzahra y col., 2016). Igualmente, tras la aplicación de probióticos,

se han podido observar mejoras en variables como temperatura, pH, oxígeno disuelto, amoníaco y sulfuro de hidrógeno en el agua de cría (Banerjee y col., 2010; El-Saadony y col., 2021).

Asimismo, el QS es un sistema de comunicación molecular entre bacterias que facilita la coordinación de su comportamiento en respuesta a la densidad poblacional y que está implicado en la regulación de diversos factores de virulencia. Ciertas cepas de probióticos tienen la capacidad de degradar las moléculas de señal empleadas en el QS, mostrándose eficaces en la disminución de la virulencia y la formación de biopelículas (Ghanei-Motlagh y col., 2021; Vadassery y Pillai, 2020).

Por otro lado, el impacto positivo de los probióticos en la salud del hospedador se refleja en un crecimiento más saludable y en la eficiente optimización del uso de los alimentos (Amoah y col., 2019). La mejora en la absorción de nutrientes puede tener repercusiones positivas en la energía, el rendimiento físico y la resistencia a condiciones de estrés ambiental (Cheng y col., 2013; Kuebutornye y col., 2020). Además, los probióticos generan múltiples beneficios al hospedador que van más allá de la simple mejora en la digestión y la absorción de nutrientes (Figura 4), destacando la modulación del sistema inmunitario del organismo, que contribuye significativamente a la resistencia frente a patógenos y a la prevención de enfermedades. También promueven el establecimiento y mantenimiento de una microbiota intestinal beneficiosa con numerosas funciones, además de una barrera protectora contra la invasión de microorganismos potencialmente dañinos (Akhter y col., 2015; El-Saadony y col., 2021; Pandiyan y col., 2013).

Los probióticos más estudiados pertenecen al filo *Firmicutes* (actualmente denominado *Bacillota*), especialmente las bacterias productoras de ácido láctico (BAL) o del género *Bacillus*. Estas bacterias no son tan habituales en entornos marinos como en otros, pero son muy aceptadas como probióticos en vertebrados (Vieco-Saiz y col., 2019; Vijayaram y Kannan, 2018). Se ha visto que son capaces de tolerar el pH ácido y las sales biliares, siendo capaces de sobrevivir en sistemas intestinales (Bentzon-Tilia y col., 2016).

Especies como la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), han sido objeto de numerosas investigaciones respecto a la incorporación de probióticos en la alimentación (Adeoye y col., 2016; Hamdan y col., 2016; Shija y col., 2023; Xia y col., 2020). Sin embargo, los estudios en dorada o lenguado senegalés son más limitados (Tablas 3 y 4). La mayoría de la información disponible se centra en una

cepa aislada por el grupo de investigación Fotobiología y Biotecnología de Organismos Acuáticos (FYBOA) de la Universidad de Málaga. Esta cepa probiótica fue identificada como *Shewanella putrefaciens*, y ha sido denominada cepa Pdp11 (SpPdp11). Procede de la piel de dorada sana y numerosas investigaciones han evaluado su idoneidad como probiótico en la cría de peces cultivados, centrándose en el cultivo de *S. aurata* y *S. senegalensis*, (resultados resumidos en las Tablas 3 y 4).

Hay que destacar que el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos supone un reto en el uso de dietas suplementadas con probióticos, dado que depende de ciertos requisitos de elaboración y almacenamiento, procesos en los que, muchas bacterias probióticas pierden su viabilidad (Nayak, 2010). Además, la proporción de bacterias viables y no viables en la preparación del alimento podría variar, y se necesitan grandes esfuerzos para realizar continuos recuentos de células vivas presentes en el pienso (Adams, 2010). Otros desafíos incluyen la dificultad de lograr la colonización efectiva en el tracto gastrointestinal del hospedador en el tiempo (Dash y col., 2015) y el riesgo de transferencia horizontal de genes de virulencia en ambientes acuáticos (Newaj-Fyzul y col., 2014). Estos problemas han llevado a explorar enfoques alternativos, por lo que cada vez son más los trabajos que analizan los efectos de los probióticos en forma de células rotas o muertas (Dawood y col., 2016; Salinas y col., 2008).

Las células bacterianas inactivadas o muertas, que funcionan como probióticos, son conocidas como "paraprobióticos". Los paraprobióticos son definidos por Shripada y col. (2020) como "células microbianas no viables (intactas o rotas), cuando se administran (por vía oral o tópica) en cantidades adecuadas, confieren un beneficio al consumidor humano o animal". Éstos han surgido como una alternativa a los probióticos porque pueden proporcionar ciertos beneficios, ofreciendo la ventaja añadida de una dosis y forma de consumo segura (Taverniti y Guglielmetti, 2011). Los microorganismos probióticos no viables han demostrado su capacidad para ejercer efectos beneficiosos, como estimular el sistema inmunitario del hospedador (De Almada y col., 2016; Taverniti y Guglielmetti, 2011) y modular la microbiota intestinal (Duc y col., 2020; Wu y col., 2020).

Tabla 3. Resumen de estudios destacados en la última década en los que se administraron bacterias probióticas al pienso de *S. aurata*

Probiótico	Concentración	Tiempo de inclusión	Efecto obtenido con respecto a la dieta control	Referencias
<i>Debaryomyces hansenii</i> BCS004	10 ⁶ UFC/g	28 días	Mejora en el sistema inmune: capacidad de fagocitosis, actividad peroxidasa y leucocitarias.	Reyes-Becerril y col., 2021
<i>L. lactis subsp. lactis</i> SL242	2 × 10 ⁹ UFC/kg	84 días	Mejora de absorción y digestión de proteínas. Sin alteraciones en la morfología o inflamación del intestino.	Moroni y col., 2021
<i>Bacillus sp.</i> R2	1×10 ⁷ UFC/mL	40 días DE	Aumento de la supervivencia y crecimiento de las larvas. Aumento del número de células caliciformes y en la longitud de las vellosidades.	Ghoname y col., 2020
<i>Planococcus sp.</i> R11				
<i>S. putrefaciens</i> Pdp11	10 ⁸ UFC/g	28 días	Aumento de IgM y actividad de la peroxidasa sérica, alteración de la microbiota intestinal.	Cordero y col., 2015
			Mejora de la inmunidad celular y humoral y del perfil de expresión génica de citoquinas proinflamatorias, en situaciones de estrés.	Cordero y col., 2016a
		30 días	Cambios proteómicos positivos en la mucosa cutánea sometida a estrés.	Cordero, y col., 2016b
	10 ⁹ UFC/g	28 días	Mejora de la actividad antioxidante principalmente en branquias y piel.	Esteban y col., 2014
	10 ⁹ UFC/g	30 días	Mejora de la enteropatía leve inducida por heridas cutáneas. Atenuación de la inflamación, prevención de la alteración de la capa de mucosa intestinal. Mejora de las uniones estrechas intestinales.	Chen y col., 2020

UFC: Unidades formadoras de colonias. DE: Después de la eclosión

Tabla 4. Resumen de estudios destacados en la última década en los que se administraron bacterias probióticas al pienso de *S. senegalensis*

Probiótico	Concentración	Tiempo de inclusión	Efecto obtenido con respecto a la dieta control	Referencias
<i>Bacillus sp.</i> , <i>Pedococcus sp.</i> , <i>Enterococcus sp.</i> y <i>Lactobacillus sp.</i>	0,3% del total del pienso	72 días	Aumento de la altura de las vellosidades intestinales y de los niveles de trombocitos, disminución de la proporción de linfocitos.	Barroso y col., 2016
<i>S. putrefaciens Pdp11</i>	10 ⁹ UFC/g	19 y 30 días	Efectos positivos en la tolerancia al estrés, la expresión génica y la microbiota intestinal.	Tapia-Paniagua y col., 2014
		10 días	OTC + probiótico: sobreexpresión de genes relacionados con efectos anti apoptóticos y regulación del estrés oxidativo. Modulación de la microbiota intestinal.	Tapia-Paniagua y col., 2015
		15 días	Alginato + probiótico: sobrerregulación de genes relacionados con la protección frente al estrés oxidativo.	Vidal y col., 2016
	10 ⁸ UFC/g	28 días	Sobreexpresión de genes <i>mhcIIa</i> en el riñón cefálico. Cambios en la microbiota intestinal.	Cordero y col., 2015
	2,5 × 10 ⁷ UFC/mL	76 días	Larvas, de 10 a 86 días después de la eclosión, experimentaron modulación en la microbiota intestinal y aumento en las relaciones DHA/EPA. Mejora del crecimiento (longitud y peso).	Lobo y col., 2014
		21 días	El probiótico fue bioencapsulado en vector vivo (<i>Artemia</i>). Larvas, de 10 a 30 días DE, mostraron un aumento en los lípidos totales (HUFA n-3) y mejor rendimiento en el crecimiento.	Lobo y col., 2018
		19 días	En larvas incrementó el tamaño, moduló la expresión de genes implicados en el crecimiento, la respuesta al estrés y la inmunidad.	Jurado y col., 2018
<i>Vibrio proteolyticus DCF12.2</i>	10 ⁶ UFC/mL	56 días	Activación de la expresión génica relacionada con la respuesta inmunitaria de los peces y aumento de la producción de anticuerpos con reacción cruzada frente a <i>P. damsela subsp. piscicida</i> y <i>V. harveyi</i>	Medina y col., 2023

OTC: oxitetraciclina; UFC: Unidades formadoras de colonias; DE: Después de la eclosión

Una vez conocidos los beneficios de SpPdp11 como probiótico, comprobar si puede utilizarse como paraprobióticos se convierte en un paso crucial, dado que podría tener implicaciones significativas en su comercialización. La investigación en esta dirección es esencial para comprender y aprovechar plenamente todo su potencial.

Finalmente, cabe destacar que la inclusión de probióticos y sus derivados, así como de componentes bioactivos en las dietas, puede influir sobre el tracto gastrointestinal y, por ende, sobre la microbiota asociada al individuo. Dado que este complejo ecosistema de microorganismos desempeña un papel crucial en la salud y el desarrollo de los animales, es esencial investigar su dinámica y evaluar si las alteraciones inducidas producen cambios fisiológicos significativos en el animal.

4. La microbiota de los teleósteos

La microbiota en los peces abarca un espectro diverso de microorganismos, protistas, hongos, bacterias, arqueas y virus (Merrifield y Rodiles, 2015). A pesar de esta riqueza microbiológica, son las bacterias las que mejor han podido conocerse, y hasta la fecha, han sido el principal enfoque de la investigación en este campo. Las investigaciones se han centrado en las comunidades microbianas que residen en áreas asociadas a mucosas, con una marcada preferencia por el tracto gastrointestinal (Wang y col., 2018; Yang y col., 2020).

A partir de investigaciones en la microbiota intestinal de peces de cultivo, se destaca de manera inequívoca la predominancia de cuatro grupos bacterianos: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* (Egerton y col., 2018). Estos cuatro grupos constituyen el pilar de la microbiota intestinal en una amplia variedad de especies de cultivo acuícola.

La dieta es un factor clave en la colonización de los microorganismos. En peces principalmente carnívoros como la dorada y el lenguado senegalés, se han identificado géneros bacterianos como *Vibrio*, *Photobacterium*, *Pseudomonas* o *Shewanella* (Tapia-Paniagua y col., 2010; Yukgehnash y col., 2020). La composición de la dieta y la procedencia de los ingredientes, ya sean de origen marino o vegetal, afectan la microbiota intestinal (Ringø y col., 2016).

Es importante destacar que factores físico-químicos y biológicos, como puede ser el estrés, además de la alimentación, también desempeñan un papel significativo

en la diversidad de la microbiota presente en el intestino de los peces (Cámara-Ruiz y col., 2022; Zhao y col., 2022). Cualquier alteración en este ecosistema microbiano puede tener repercusiones significativas en la salud y fisiología del organismo. El equilibrio de la comunidad microbiana en simbiosis con el organismo se conoce como eubiosis y es una condición indispensable para la correcta ejecución de sus funciones; cuando este equilibrio se rompe y se produce un estado patológico en el individuo, se conoce como disbiosis (Al-Rashidi, 2022).

4.1. Funciones de la microbiota

Está bien documentado que la dieta influye significativamente en la salud de los animales y que una alimentación nutritiva ofrece numerosas ventajas para su bienestar general (Oliva-Teles, 2012). Además de cumplir con las necesidades nutricionales básicas, la dieta de un animal también es capaz de alterar a los microorganismos que habitan en simbiosis con el organismo (Escalas y col., 2021; Liu y col., 2016). Sin embargo, todavía se intenta comprender plenamente la enorme contribución de la microbiota a este efecto.

Los microorganismos asociados simbióticamente con un hospedador desempeñan numerosas funciones vitales para la supervivencia del animal. Es sabido que la microbiota intestinal posee una tarea clave en la nutrición, involucrada en el metabolismo de los nutrientes, especialmente en el metabolismo y tráfico del colesterol (Bates y col., 2006). Se encarga de fermentar compuestos no digeribles y producir aminoácidos, enzimas digestivas y metabolitos, ya que estas bacterias contienen una amplia gama de actividades como carbohidrasas, fosfatasas, proteasas y lipasas que contribuyen a la digestión del animal (Nayak, 2010; Ramirez y Dixon, 2003; Skrodenyte-Arbaciauskiene y col., 2006). Además, destaca su papel en la síntesis de ácidos grasos volátiles de cadena corta, productos finales de la fermentación anaeróbica y la producción de vitaminas (Dailey y col., 2016; Yang y col., 2020).

Otra de las funciones de la microbiota está relacionada con su participación en la diferenciación y maduración epitelial (Burns y col., 2016). La microbiota se encuentra vinculada con la actividad de la fosfatasa alcalina, que es un marcador de la maduración epitelial, así como las células caliciformes secretoras de mucus y las células enteroendocrinas secretoras de hormonas (Bates y col., 2006). Una mucosa intestinal madura también es esencial para distinguir microorganismos patógenos de los comensales a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, como los receptores tipo Toll, receptores tipo RIG-I, receptores

tipo NOD y receptores tipo AIM2), que detectan antígenos bacterianos y activan cascadas de señalización para regular las respuestas inmunitarias (citoquinas) (Pérez y col., 2010).

Las comunidades microbianas asociadas a las mucosas desempeñan un papel crítico en las defensas del hospedador, estableciendo un equilibrio a través de la competencia por los sitios de adhesión, lo que puede limitar o reducir la proliferación de patógenos (Merrifield y Rodiles, 2015). Estos microorganismos tienen la capacidad de competir con los patógenos mediante la producción de diversos compuestos, como ácidos orgánicos, sideróforos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y péptidos antimicrobianos (Medina-Félix y col., 2023). Las mucosas de la piel, las branquias y el tracto gastrointestinal constituyen las principales vías de entrada de patógenos en los peces (Bøgwald y Dalmo, 2014; Ringø et al., 2007). El tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT), compuesto por el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), el tejido linfoide asociado a las branquias (GIALT) y el tejido linfoide asociado a la piel (SALT), no solo atrapan patógenos, sino que también interfieren con ellos gracias a la acción de diversos factores antimicrobianos presentes en el moco, tales como lectinas, lisozimas, pentraxinas, proteínas del complemento, péptidos antibacterianos e inmunoglobulinas (Salinas y col., 2021).

Los microorganismos asociados a las mucosas varían dependiendo del órgano asociado, proporcionando características únicas y relaciones simbióticas especializadas (Lowrey y col., 2015). Sin embargo, se ha visto que existe una conexión entre las distintas mucosas del organismo. Los microorganismos que habitan en ellas secretan moléculas que pueden actuar localmente sobre el epitelio de la mucosa o sistémicamente si ingresan a la circulación del hospedador, y que pueden ejercer, entre otros, efectos inmunoestimuladores o inmunosupresores tanto en las células del sistema inmunitario innato como del adaptativo (Kelly & Salinas, 2017). Estas moléculas, dependiendo de la permeabilidad del epitelio, acceden al torrente sanguíneo y pueden influir en tejidos distales (Figura 5).

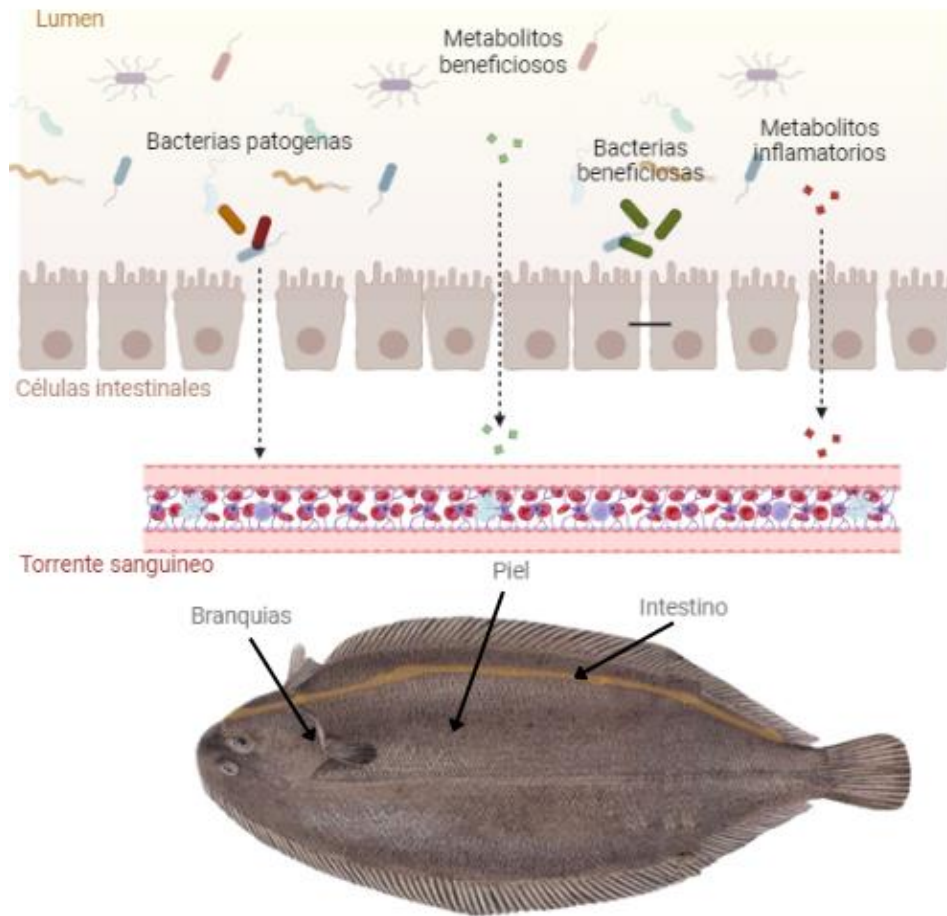


Figura 5. Esquema sobre la comunicación entre la microbiota intestinal y los tejidos como el intestino, la piel o las branquias (Elaboración propia generada con Biorender).

Por ejemplo, investigaciones en modelos murinos muestran que la suplementación con el probiótico *Lactobacillus reuteri* mejora la integridad dérmica, evidenciando un mecanismo subyacente con base inmunitaria, donde existe una modulación de linfocitos T reguladores y citoquinas inmunitarias (Levkovich y col., 2013). Adicionalmente, diversos estudios en humanos sugieren una asociación entre la disbiosis intestinal y enfermedades inflamatorias de la piel (Stolfi y col., 2022), e incluso se ha identificado ADN de bacterias intestinales circulante en pacientes con psoriasis (Ramírez-Boscá y col., 2015). En dorada, la adición del probiótico *B. subtilis* reforzó la unión célula-célula que se encuentra en el epitelio intestinal (Cerezuela y col., 2013) y el probiótico Spdp11 mejoró los daños en el intestino provocados tras un daño inflamatorio en la piel (Chen y col., 2020).

Por lo tanto, es evidente que, tras una alteración dietética, es necesario conocer las variaciones de la microbiota del pez para poder evidenciar cambios futuros a nivel fisiológico.

4.2. Estrategias para el avance en el estudio de la microbiota

Los avances en las técnicas de secuenciación de ADN han permitido un notable progreso en la comprensión de los microorganismos que coexisten en simbiosis con los animales. Esto es particularmente relevante, dado que la mayoría de los microorganismos que habitan en estas comunidades no son cultivables en el laboratorio, y en décadas pasadas, su estudio se limitaba a métodos de cultivo y pruebas fenotípicas y bioquímicas para su identificación. Incluso técnicas más avanzadas como la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), dejaban fuera gran cantidad de microorganismos cuya abundancia menor al 1-5% los hacía indetectables en las bandas del gel (Cordero y col., 2015; Muyzer y col., 1993; Tapia-Paniagua y col., 2015) y poseía limitaciones principalmente en la resolución taxonómica, con posibles sesgos, que dificultaba la interpretación de los resultados (Xia y col., 2024).

Actualmente, el empleo de técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) han revolucionado el estudio de comunidades microbianas, permitiendo la detección y cuantificación precisa de microorganismos incluso en abundancias muy bajas (Skopina y col., 2016). La más popular hasta el momento es la secuenciación del amplicón ADNr 16S, que consiste en amplificar y secuenciar una región específica del gen que codifica el ADN ribosómico 16S, un componente esencial del ribosoma bacteriano. Esta región es ideal para estudios de diversidad y filogenia microbiana debido a su estructura conservada y regiones variables, que permiten distinguir entre diferentes especies (Ghanbari y col., 2015). Sin embargo, cada vez se usa más la secuenciación masiva que, en lugar de secuenciar regiones específicas, secuencia todo el ADN previa fragmentación de forma aleatoria (*shotgun sequencing*). Este tipo de secuenciación se puede aplicar para la identificación de los metagenomas presentes en una muestra ambiental, siendo mucho más precisa para el conocimiento de las especies presentes (Breitwieser y col., 2019).

Asimismo, las funciones que pueden estar llevando a cabo los microorganismos que coexisten con los peces, pueden revelar información sobre la relación entre la microbiota y la fisiología del hospedador (Rooks y Garrett, 2016), y nos permite explorar la dinámica de estos perfiles en respuesta a variables como la alimentación (Ghanbari y col. 2015). A partir de la secuenciación masiva de ADN total, se puede obtener la abundancia de los genes presentes en la muestra bacteriana. Sin embargo, debido a los altos costes de la secuenciación de ADN

total, se han desarrollado programas predictivos que utilizan la abundancia calculada a partir de los datos de secuenciación del amplicón ADNr 16S para predecir funciones. Programas como PICRUSt (Langille y col., 2013) o TAX4Fun (Aßhauer y col., 2015), mediante algoritmos predictivos, permiten inferir las funciones metabólicas y biológicas que pueden llevar a cabo las bacterias presentes en una muestra determinada.

Además, en esta tesis, se aborda el estudio de redes de coocurrencia para identificar y analizar las interacciones entre diferentes especies o grupos microbianos dentro del ecosistema estudiado, obteniendo patrones de asociación y relaciones ecológicas que no son evidentes mediante observaciones directas. Estas redes se construyen a partir de datos de abundancia de especies en múltiples muestras, donde los nodos representan especies y las conexiones indican el tipo de correlación que tienen (Siles y col., 2021). Al considerar las interacciones entre poblaciones microbianas, se obtiene una visión más completa de cómo estas comunidades podrían actuar conjuntamente para mantener la salud y el equilibrio del ecosistema (Siles y col., 2021).

La integración de los diferentes datos “-ómicos” de secuenciación masiva (*High-Throughput Sequencing*, HTS) con datos de otros estudios, como perfiles transcriptómicos o cortes histológicos, permitirá obtener una visión más completa de los efectos de las dietas funcionales. Esto ayudará a identificar los componentes clave de estas dietas y a optimizar su formulación para obtener los mejores resultados en términos de salud, crecimiento y resistencia a enfermedades. Es necesario la implementación de nuevas tecnologías, adecuadas a la necesidad del momento, para mantener en desarrollo la industria acuícola (Tripathy y col., 2022).

Por último, es importante destacar que la bioinformática se encuentra en constante actualización, debido al rápido desarrollo de nuevas técnicas y herramientas analíticas, lo que implica que tanto investigadores como profesionales de la acuicultura, deban estar al tanto de los últimos avances y actualizaciones en el campo, para aprovechar al máximo su potencial. A medida que se generan más datos y se descubren nuevas técnicas, la bioinformática seguirá evolucionando y desempeñando un papel fundamental en la toma de decisiones y en el avance del sector.

Referencias

- Abdala-Díaz, R. T., García-Márquez, J., Rico, R. M., Gómez-Pinchetti, J. L., Mancera, J. M., Figueroa, F. L., Alarcón, F. J., Martínez-Manzaneres, E., & Moriñigo, M. Á. (2021). Effects of a short pulse administration of *Ulva rigida* on innate immune response and intestinal microbiota in *Sparus aurata* juveniles. *Aquaculture Research*, 52(7), 3038–3051. <https://doi.org/10.1111/are.15148>
- Abdelrahman, H. A., Hemstreet, W. G., Roy, L. A., Hanson, T. R., Beck, B. H., & Kelly, A. M. (2023). Epidemiology and economic impact of disease-related losses on commercial catfish farms: A seven-year case study from Alabama, USA. *Aquaculture*, 566. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739206>
- Abidin, A. A. Z., Yusof, Z. N. B., & Yokthongwattana, C. (2021). Carotenogenesis in *Nannochloropsis oculata* under oxidative and salinity stress. *Sains Malaysiana*, 50(2), 327–337. <https://doi.org/10.17576/jsm-2021-5002-05>
- Adams, A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish & Shellfish Immunology*, 90, 210–214. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.066>
- Adams, C. A. (2010). The probiotic paradox: Live and dead cells are biological response modifiers. *Nutrition Research Reviews*, 23(1), 37–46. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000090>
- Adeoye, A. A., Yomla, R., Jaramillo-Torres, A., Rodiles, A., Merrifield, D. L., & Davies, S. J. (2016). Combined effects of exogenous enzymes and probiotic on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, intestinal morphology and microbiome. *Aquaculture*, 463, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.028>
- Ahmad, M., & Ibrahim, S. (2016). Local fish meal formulation: Its principles, prospects and problems in fishery industry. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4(1), 276–279.
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., & Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. In *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2), 733–741. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.038>
- Al-Rashidi, H. E. (2022). Gut microbiota and immunity relevance in eubiosis and dysbiosis. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(3), 1628–1643. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.10.068>
- Amoah, K., Huang, Q. C., Tan, B. P., Zhang, S., Chi, S. Y., Yang, Q. H., Liu, H. Y., & Dong, X. H. (2019). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 87, 796–808. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.029>
- Arechavala-Lopez, P., Cabrera-Álvarez, M. J., Maia, C. M., & Saraiva, J. L. (2022). Environmental enrichment in fish aquaculture: A review of fundamental and practical aspects. *Reviews in Aquaculture*, 14(2), 704–728. <https://doi.org/10.1111/raq.12620>
- Assefa, A., & Abunna, F. (2018). Maintenance of fish health in aquaculture: review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. *Veterinary Medicine International*, 2018, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>
- Aßhauer, K. P., Wemheuer, B., Daniel, R., & Meinicke, P. (2015). Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics*, 31(17), 2882–2884. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv287>

- Banerjee, S., Khatoon, H., Shariff, M., & Yusoff, F. M. (2010). Enhancement of *Penaeus monodon* shrimp postlarvae growth and survival without water exchange using marine *Bacillus pumilus* and periphytic microalgae. *Fisheries Science*, 76(3), 481–487. <https://doi.org/10.1007/s12562-010-0230-x>
- Barreto, A., Pinto, W., Rodrigues, A., Rocha, R. J. M., Unamunzaga, C., Silva, T., Dias, J., & Conceição, L. E. C. (2021). *Phaeodactylum tricornutum* biomass in microdiets enhances Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larval growth performance during weaning. *Journal of Applied Phycology*, 33(4), 2233–2240. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02444-w>
- Barroso, C., Ozório, R. O. A., Afonso, A., Moraes, J. R. E., & Costas, B. (2016). Immune responses and gut morphology in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) fed dietary probiotic supplementation and following exposure to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture Research*, 47(3), 951–960. <https://doi.org/10.1111/are.12553>
- Bates, J. M., Mittge, E., Kuhlman, J., Baden, K. N., Cheesman, S. E., & Guillemin, K. (2006). Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Developmental Biology*, 297(2), 374–386. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2006.05.006>
- Bentzon-Tilia, M., Sonnenschein, E. C., & Gram, L. (2016). Monitoring and managing microbes in aquaculture – Towards a sustainable industry. *Microbial Biotechnology*, 9(5), 576–584. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12392>
- Boglione, C., Gavaia, P., Koumoundouros, G., Gisbert, E., Moren, M., Fontagné, S., & Witten, P. E. (2013). Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: Normal and anomalous skeletogenic processes. *Reviews in Aquaculture*, 5(SUPPL.1), S99–S120. <https://doi.org/10.1111/raq.12015>
- Bøgwald, J., & Dalmo, R. A. (2014). Gastrointestinal pathogenesis in aquatic animals. *Aquaculture Nutrition* (pp. 53–74). <https://doi.org/10.1002/9781118897263.ch3>
- Bongiorno, T., Foglio, L., Proietti, L., Vasconi, M., Moretti, V. M., Lopez, A., Carminati, D., Galafat, A., Vizcaíno, A. J., Acién Fernández, F. G., Alarcón, F. J., & Parati, K. (2022). Hydrolyzed microalgae from biorefinery as a potential functional ingredient in *Siberian sturgeon* (*A. baerii* Brandt) aquafeed. *Algal Research*, 62, 102592. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102592>
- Bosma, R. H., & Verdegem, M. C. J. (2011). Sustainable aquaculture in ponds: Principles, practices and limits. *Livestock Science*, 139(1–2), 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2011.03.017>
- Boyd, C. E., McNevin, A. A., & Davis, R. P. (2022). The contribution of fisheries and aquaculture to the global protein supply. *Food Security*, 14(3), 805–827. <https://doi.org/10.1007/S12571-021-01246-9>
- Breitwieser, F. P., Lu, J., & Salzberg, S. L. (2019). A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1125–1136. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx120>
- Burns, A. R., Stephens, W. Z., Stagaman, K., Wong, S., Rawls, J. F., Guillemin, K., & Bohannan, B. J. M. (2016). Contribution of neutral processes to the assembly of gut microbial communities in the zebrafish over host development. *The ISME Journal*, 10(3), 655–664. <https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2015.142>
- Cai, X., Huang, Q., & Wang, S. (2015). Isolation of a novel lutein-protein complex from *Chlorella vulgaris* and its functional properties. *Food and Function*, 6(6), 1893–1899. <https://doi.org/10.1039/c4fo01096e>

- Cámara-Ruiz, M., García-Beltrán, J. M., Cerezo, I. M., Balebona, M. C., Moriñigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2022). Immunomodulation and skin microbiota perturbations during an episode of chronic stress in gilthead seabream. *Fish and Shellfish Immunology*, 122, 234–245. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.02.011>
- Cañavate, J. P. (2005). Opciones del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 para diversificar la acuicultura marina. *Boletín - Instituto Español de Oceanografía*, 21(1–4), 147–154.
- Cerezuela, R., Meseguer, J., & Esteban, M. Á. (2013). Effects of dietary inulin, *Bacillus subtilis* and microalgae on intestinal gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 34(3), 843–848. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.12.026>
- Chabrilón, M., Rico, R. M., Arijo, S., Díaz-Rosales, P., Balebona, M. C., & Moriñigo, M. A. (2005). Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, 28(9), 531–537. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2761.2005.00657.X>
- Chen, Z., Ceballos-Francisco, D., Guardiola, F. A., & Ángeles Esteban, M. (2020). Influence of skin wounds on the intestinal inflammatory response and barrier function: Protective role of dietary *Shewanella putrefaciens* SpPdp11 administration to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & shellfish immunology*, 99, 414–423. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.02.022>
- Cheng, W., Chiu, C. S., Guu, Y. K., Tsai, S. T., & Liu, C. H. (2013). Expression of recombinant phytase of *Bacillus subtilis* E20 in *Escherichia coli* HMS 174 and improving the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, juveniles by using phytase-pretreated soybean meal-containing diet. *Aquaculture Nutrition*, 19(2), 117–127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00946.x>
- Colombo, S. M., Roy, K., Mraz, J., Wan, A. H. L., Simon, I., Davies, J., Tibbetts, S. M., Øverland, M., David, I., Francis, S., Rocker, M. M., Gasco, L., Spencer, E., Metian, M., Trushenski, J. T., & Turchini, G. M. (2022). Towards achieving circularity and sustainability in feeds for farmed blue foods. <https://doi.org/10.1111/raq.12766>
- Cordero, H., Guardiola, F. A., Tapia-Paniagua, S. T., Cuesta, A., Meseguer, J., Balebona, M. C., Moriñigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2015). Modulation of immunity and gut microbiota after dietary administration of alginate encapsulated *Shewanella putrefaciens* Pdp11 to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 608–618. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.010>
- Cordero, H., Morcillo, P., Cuesta, A., Brinchmann, M. F., & Esteban, M. A. (2016a). Differential proteome profile of skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*) after probiotic intake and/or overcrowding stress. *Journal of Proteomics*, 132, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.11.017>
- Cordero, H., Morcillo, P., Meseguer, J., Cuesta, A., & Esteban, M. Á. (2016b). Effects of *Shewanella putrefaciens* on innate immunity and cytokine expression profile upon high stocking density of gilthead seabream specimens. *Fish & Shellfish Immunology*, 51, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.02.008>
- Craig, S., Kuhn, D., & Schwarz, M. (2017). Understanding fish nutrition, feeds, and feeding systems. *Virginia Cooperative Extension*, 1–6.
- Cyrus, M. D., Bolton, J. J., Scholtz, R., & Macey, B. M. (2015). The advantages of *Ulva* (Chlorophyta) as an additive in sea urchin formulated feeds: Effects on palatability, consumption and digestibility. *Aquaculture Nutrition*, 21(5), 578–591. <https://doi.org/10.1111/anu.12182>

Dailey, F. E., McGraw, J. E., Jensen, B. J., Bishop, S. S., Lokken, J. P., Dorff, K. J., Ripley, M. P., & Munro, J. B. (2016). The microbiota of freshwater fish and freshwater niches contain omega-3 fatty acid-producing *Shewanella* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(1), 218–231. <https://doi.org/10.1128/AEM.02266-15>

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

Dawood, M. A.O., Koshio, S., Ishikawa, M., & Yokoyama, S. (2016). Effects of dietary inactivated *Pediococcus pentosaceus* on growth performance, feed utilization and blood characteristics of red sea bream, *Pagrus major* juvenile. *Aquaculture Nutrition*, 22(4), 923–932. <https://doi.org/10.1111/ANU.12314>

Dawood, Mahmoud A.O., Koshio, S., & Esteban, M. Á. (2018). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 950–974. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12209>

De Almada, C. N., Almada, C. N., Martinez, R. C. R., & Santana, A. S. (2016). *Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.011>

de Azevedo, A. M., Losada, A. P., Ferreiro, I., Riaza, A., Losada, V., Russo, T., Boglione, C., Vázquez, S., & Quiroga, M. I. (2021). Skeletal anomalies in senegalese sole (*Solea senegalensis*, kaup) fed with different commercial enriched artemia: A study in postlarvae and juveniles. *Animals*, 11(1), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ani11010022>

Dhanasiri, A. K. S., Johnny, A., Xue, X., Berge, G. M., Borgevik, A. S., Rise, M. L., Fæste, C. K., & Fernandes, J. M. O. (2020). Plant-based diets induce transcriptomic changes in muscle of zebrafish and atlantic salmon. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.575237>

Diken, G., Demir, O., & Naz, M. (2016). the potential inhibitory effects of microalgae and macroalgae on protease activities of *Argyrosomus regius* (Pisces, Scianidae) larvae using in vitro assays. *Agriculture & Food ISSN*, 4(1). www.scientific-publications.net

Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The gut microbiota of marine fish. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>

El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Patra, A. K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M. A. O., Dhama, K., & Abdel-Latif, H. M. R. (2021). The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. *Fish and Shellfish Immunology*, 117, 36–52. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.007>

Escalas, A., Auguet, J. C., Avouac, A., Seguin, R., Gradel, A., Borrossi, L., & Villéger, S. (2021). Ecological specialization within a carnivorous fish family is supported by a herbivorous microbiome shaped by a combination of gut traits and specific diet. *Frontiers in Marine Science*, 8, 622883. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.622883>

Esteban, M. A., Cordero, H., Martínez-Tomé, M., Jiménez-Monreal, A. M., Bakhrouf, A., & Mahdhi, A. (2014). Effect of dietary supplementation of probiotics and palm fruits extracts on the antioxidant enzyme gene expression in the mucosae of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 39(2), 532–540. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.012>

FAO. (2023). *El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2023. Urbanización, transformación de los sistemas agroalimentarios y dietas saludables a lo largo del continuo rural-urbano*.

- Fatsini, E., González, W., Ibarra-Zatarain, Z., Napuchi, J., & Duncan, N. J. (2020). The presence of wild Senegalese sole breeders improves courtship and reproductive success in cultured conspecifics. *Aquaculture*, 519, 734922. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734922>
- Flores-Kossack, C., Montero, R., Köllner, B., & Maisey, K. (2020). Chilean aquaculture and the new challenges: Pathogens, immune response, vaccination and fish diversification. *Fish & Shellfish Immunology*, 98(June 2019), 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.093>
- Ghanbari, M., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2015). A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, 448, 464–475. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>
- Ghanei-Motlagh, R., Mohammadian, T., Gharibi, D., Khosravi, M., Mahmoudi, E., Zarea, M., El-Matbouli, M., & Menanteau-Ledouble, S. (2021). Quorum quenching probiotics modulated digestive enzymes activity, growth performance, gut microflora, haemato-biochemical parameters and resistance against *Vibrio harveyi* in Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture*, 531(July 2020). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735874>
- Ghoname, R. M., El-Sayed*, H. S., Ghazlan, H. A., & Sabry, S. A. (2020). Application of probiotic bacteria for the improvement of sea bream (*Sparus aurata*) larval production. 24(1), 371–398. www.ejabf.journals.ekb.eg
- Gilannejad, N., Moyano, F. J., Martínez-Rodríguez, G., & Yúfera, M. (2021). Feeding Protocol Modulates the Digestive Process in Senegalese Sole (*Solea senegalensis*) Juveniles. *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.698403>
- Grigorakis, K. (2017). Fillet proximate composition, lipid quality, yields, and organoleptic quality of Mediterranean-farmed marine fish: A review with emphasis on new species. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(14), 2956–2969. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1081145>
- Guedes, A. C., Sousa-Pinto, I., & Malcata, F. X. (2015). Application of Microalgae Protein to Aquafeed. *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*, 93–125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00008-X>
- Guerreiro, I., Magalhães, R., Coutinho, F., Couto, A., Sousa, S., Delerue-Matos, C., Domingues, V. F., Oliva-Teles, A., & Peres, H. (2019). Evaluation of the seaweeds *Chondrus crispus* and *Ulva lactuca* as functional ingredients in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 2115–2124. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1708-7>
- Gümüş, B., & Balaban, M. O. (2010). Prediction of the weight of aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by image analysis. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 19(3–4), 227–237. <https://doi.org/10.1080/10498850.2010.508869>
- Hamdan, A. M., El-Sayed, A. F. M., & Mahmoud, M. M. (2016). Effects of a novel marine probiotic, *Lactobacillus plantarum* AH 78, on growth performance and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology*, 120(4), 1061–1073. <https://doi.org/10.1111/JAM.13081>
- Hamre, K., Yúfera, M., Rønnestad, I., Boglione, C., Conceição, L. E. C., & Izquierdo, M. (2013). Fish larval nutrition and feed formulation: Knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. *Reviews in Aquaculture*, 5(SUPPL.1). <https://doi.org/10.1111/J.1753-5131.2012.01086.X>
- Hossain, A., Habibullah-Al-Mamun, M., Nagano, I., Masunaga, S., Kitazawa, D., & Matsuda, H. (2022). Antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and resistance genes in aquaculture: risks, current concern, and future thinking. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(8), 11054–11075. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17825-4>

- Hua, K., Cobcroft, J. M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D. R., Mangott, A., Praeger, C., Vucko, M. J., Zeng, C., Zenger, K., & Strugnelli, J. M. (2019). The Future of Aquatic Protein: Implications for Protein Sources in Aquaculture Diets. *One Earth*, 1(3), 316–329. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2019.10.018>
- Irianto, A., & Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 25(11), 633–642. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00422.x>
- Jiang, W. D., Zhou, X. Q., Zhang, L., Liu, Y., Wu, P., Jiang, J., Kuang, S. Y., Tang, L., Tang, W. N., Zhang, Y. A., Shi, H. Q., & Feng, L. (2019). Vitamin A deficiency impairs intestinal physical barrier function of fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 546–558. <https://doi.org/10.1016/j.FSI.2019.01.056>
- Ju, Z. Y., Deng, D. F., Dominy, W. G., & Forster, I. P. (2011). Pigmentation of pacific white shrimp, *litopenaeus vannamei*, by dietary astaxanthin extracted from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(5), 633–644. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00511.x>
- Jurado, J., Villasanta-González, A., Tapia-Paniagua, S. T., Balebona, M. C., García de la Banda, I., Morínigo, M. Á., & Prieto-Álamo, M. J. (2018). Dietary administration of the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 promotes transcriptional changes of genes involved in growth and immunity in *Solea senegalensis* larvae. *Fish & Shellfish Immunology*, 77, 350–363. <https://doi.org/10.1016/j.FSI.2018.04.018>
- Kandathil Radhakrishnan, D., AkbarAli, I., Schmidt, B. V., John, E. M., Sivanpillai, S., & Thazhakot Vasunambesan, S. (2020). Improvement of nutritional quality of live feed for aquaculture: An overview. *Aquaculture Research*, 51(1), 1–17. <https://doi.org/10.1111/are.14357>
- Keeble, B. R. (1988). World comision on environment development. *Medicine and War*, 4(1), 17–25. <https://doi.org/10.1080/07488008808408783>
- Kelly, C., & Salinas, I. (2017). Under pressure: Interactions between commensal microbiota and the teleost immune system. *Frontiers in Immunology*, 8(MAY), 1. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00559>
- Kennedy, D. A., Kurath, G., Brito, I. L., Purcell, M. K., Read, A. F., Winton, J. R., & Wargo, A. R. (2016). Potential drivers of virulence evolution in aquaculture. *Evolutionary Applications*, 9(2), 344–354. <https://doi.org/10.1111/eva.12342>
- Kent, M. L. (2000). Marine netpen farming leads to infections with some unusual parasites. *International Journal for Parasitology*, 30(3), 321–326. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00018-7)
- Kholil, M. I., Hossain, M. M. M., Neowajh, M. S., Islam, M. S., & Kabir, M. (2015). Comparative efficiency of some commercial antibiotics against *Pseudomonas* infection in fish. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2(3), 114–117. <https://doi.org/10.22271/fish.2015.v2.i3b.225>
- Kozasa, M. (1986). Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. *Microbiologie Aliments Nutrition*, 4(2), 121–135. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573105975120474496>
- Krkošek, M. (2010). Host density thresholds and disease control for fisheries and aquaculture. In *Aquaculture Environment Interactions*, 1(1), 21–32.. <https://doi.org/10.3354/aei0004>
- Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D., Sakyi, M. E., Lu, Y., & Wang, Z. (2020). Modulation of nutrient utilization, growth, and immunity of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: the role of probiotics. *Aquaculture International*, 28(1), 277–291. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00463-6>
- La Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR). (2023). *La Acuicultura en España* (p. 107). www.apromar.es

- Lafferty, K. D., Harvell, C. D., Conrad, J. M., Friedman, C. S., Kent, M. L., Kuris, A. M., Powell, E. N., Rondeau, D., & Saksida, S. M. (2015). Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Annual Review of Marine Science*, 7(7), 471–496. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015646>
- Lall, S. P., & Kaushik, S. J. (2021). Nutrition and Metabolism of Minerals in Fish. *Animals* 2021, Vol. 11, Page 2711, 11(9), 2711. <https://doi.org/10.3390/ANI11092711>
- Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepile, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., Beiko, R. G., & Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31(9), 814–821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>
- Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., Brinchmann, M. F., & Kiron, V. (2011). In vitro adherence of two candidate probiotics from Atlantic cod and their interference with the adhesion of two pathogenic bacteria. *Veterinary Microbiology*, 148(2–4), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.024>
- Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., & Estante, E. G. (2015). Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(1), 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.023>
- Levkovich, T., Poutahidis, T., Smillie, C., Varian, B. J., Ibrahim, Y. M., Lakritz, J. R., Alm, E. J., & Erdman, S. E. (2013). Probiotic bacteria induce a ‘glow of health’. *PLoS ONE*, 8(1), e53867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053867>
- Lieke, T., Meinelt, T., Hoseinifar, S. H., Pan, B., Straus, D. L., & Steinberg, C. E. W. (2020). Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish diseases. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 943–965. <https://doi.org/10.1111/raq.12365>
- Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F., & Wang, W. (2016). The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Scientific Reports*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep24340>
- Lobo, C., Martín, M. V., Moreno-Ventas, X., Tapia-Paniagua, S. T., Rodríguez, C., Moriñigo, M. A., & de la Banda, I. (2018). *Shewanella putrefaciens* Pdp11 probiotic supplementation as enhancer of Artemia n-3 HUFA contents and growth performance in Senegalese sole larviculture. *Aquaculture Nutrition*, 24(1), 548–561. <https://doi.org/10.1111/ANU.12587>
- Lobo, C., Tapia-Paniagua, S., Moreno-Ventas, X., Alarcón, F. J., Rodríguez, C., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., & de La Banda, I. G. (2014). Benefits of probiotic administration on growth and performance along metamorphosis and weaning of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 433, 183–195. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2014.06.011>
- Lowrey, L., Woodhams, D. C., Tacchi, L., & Salinas, I. (2015). Topographical mapping of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) microbiome reveals a diverse bacterial community with antifungal properties in the skin. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19), 6915–6925. <https://doi.org/10.1128/AEM.01826-15>
- Ma, K., Bao, Q., Wu, Y., Chen, S., Zhao, S., Wu, H., & Fan, J. (2020). evaluation of microalgae as immunostimulants and recombinant vaccines for diseases prevention and control in aquaculture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.590431>
- Maldonado-Miranda, J. J., Castillo-Pérez, L. J., Ponce-Hernández, A., & Carranza-Álvarez, C. (2022). Summary of economic losses due to bacterial pathogens in aquaculture industry. In *Bacterial Fish Diseases* 399–417. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85624-9.00023-3>

- Manchanayake, T., Salleh, A., Amal, M. N. A., Yasin, I. S. M., & Zamri-Saad, M. (2023). Pathology and pathogenesis of *Vibrio* infection in fish: a review. *Aquaculture Reports* 28. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101459>
- Manirafasha, E., Ndikubwimana, T., Zeng, X., Lu, Y., & Jing, K. (2016). Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochemical Engineering Journal* 109, 282–296. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.025>
- Martínez-Antequera, F. P., Martos-Sitcha, J. A., Reyna, J. M., & Moyano, F. J. (2021). Evaluation of the inclusion of the green seaweed *Ulva ohnoi* as an ingredient in feeds for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Animals*, 11(6), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ani11061684>
- Medina-Félix, D., Garibay-Valdez, E., Vargas-Albores, F., & Martínez-Porchas, M. (2023). Fish disease and intestinal microbiota: A close and indivisible relationship. *Reviews in Aquaculture*, 15(2), 820–839. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12762>
- Medina, A., García-Márquez, J., Moriñigo, M. Á., & Arijo, S. (2023). Effect of the potential probiotic *Vibrio proteolyticus* DCF12.2 on the immune system of *Solea senegalensis* and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Vibrio harveyi*. *Fishes*. 8(7), 344. <https://doi.org/10.3390/FISHES8070344>
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T. M., Bøgwald, J., Castex, M., & Ringø, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.007>
- Merrifield, D. L., & Rodiles, A. (2015). The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. *Mucosal Health in Aquaculture*, 273–295. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00010-8>
- Minh Duc, P., Nay Myo, H., Thi Tuyet Hoa, T., Thanh Liem, P., Onoda, S., & Thi Thanh Hien, T. (2020). Effects of heat killed *Lactobacillus plantarum* (HK L-137) supplemental diets on growth, survival and health of juvenile striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 10(3), 761. <https://doi.org/10.29322/IJSRP.10.03.2020.p9993>
- Mohamad, N., Noor, M., Amal, A., Salwany, I., Yasin, M., Saad, Z., Nasruddin, S., Al-Saari F, N., Mino, S., & Sawabe, T. (2019). Vibriosis in cultured marine fishes: a review. *Aquaculture*, 512, 734289. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734289>
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., DeBoeck, G., & Mohanta, K. N. (2013). Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97(3), 405–430. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01301.x>
- Mondal, H., & Thomas, J. (2022). A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture. *Aquaculture International*, 30(4), 1971–2000. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00884-w>
- Morais, S., Aragão, C., Cabrita, E., Conceição, L. E. C., Constenla, M., Costas, B., Dias, J., Duncan, N., Engrola, S., Estevez, A., Gisbert, E., Mañanós, E., Valente, L. M. P., Yúfera, M., & Dinis, M. T. (2016). New developments and biological insights into the farming of *Solea senegalensis* reinforcing its aquaculture potential. *Reviews in Aquaculture*, 8(3), 227–263. <https://doi.org/10.1111/raq.12091>
- Moretti, A., Fernandez-Criado, M. P., & Vetillart, R. (2005). Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream, Volume 2. FAO, 2, 194. <http://tvhhdh.vnio.org.vn:8080/xmlui/handle/123456789/9239>

- Moroni, F., Naya-Català, F., Piazzon, M. C., Rimoldi, S., Caldach-Giner, J., Giardini, A., Martínez, I., Brambilla, F., Pérez-Sánchez, J., & Terova, G. (2021). The effects of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain used as probiotic on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, gut microbiota, and transcriptional response. *Frontiers in Marine Science*, 8, 659519. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2021.659519/>
- Moutinho, S., Linares, F., Rodríguez, J. L., Sousa, V., & Valente, L. M. P. (2018). Inclusion of 10% seaweed meal in diets for juvenile and on-growing life stages of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Applied Phycology*, 30(6), 3589–3601. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1482-6>
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993>
- Navarro-Guillén, C., Yúfera, M., & Engrola, S. (2017). Daily feeding and protein metabolism rhythms in Senegalese sole post-larvae. *Biology Open*, 6(1), 77–82. <https://doi.org/10.1242/bio.021642>
- Nayak, S. K. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(1), 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>
- Nayak, Sukanta K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41(11), 1553–1573. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2109.2010.02546.X>
- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Buschmann, A. H., Bush, S. R., Cao, L., Klinger, D. H., Little, D. C., Lubchenco, J., Shumway, S. E., & Troell, M. (2021). A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, 591(7851), 551–563. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-6>
- Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A. H., & Austin, B. (2014). Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture* 431, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.026>
- Oliva-Teles, A. (2012). Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases* 35(2), 83–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x>
- Ottinger, M., Clauss, K., & Kuenzer, C. (2016). Aquaculture: Relevance, distribution, impacts and spatial assessments - A review. *Ocean and Coastal Management*, 119, 244–266. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2015.10.015>
- Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E. G. J., Subaramaniyan, K., Manikkam, S., & Sadayappan, B. (2013). Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today*, 5(1), 55–59. <https://doi.org/10.1016/J.DIT.2013.03.003>
- Passos, R., Correia, A. P., Ferreira, I., Pires, P., Pires, D., Gomes, E., do Carmo, B., Santos, P., Simões, M., Afonso, C., & Baptista, T. (2021). Effect on health status and pathogen resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed with diets supplemented with *Gracilaria gracilis*. *Aquaculture*, 531. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735888>
- Peixoto, D., Pinto, W., Gonçalves, A. T., Machado, M., Reis, B., Silva, J., Navalho, J., Dias, J., Conceição, L., & Costas, B. (2021). Microalgal biomasses have potential as ingredients in microdiets for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) post-larvae. *Journal of Applied Phycology*, 33(4), 2241–2250. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02431-1>

- Pérez, T., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., Halaihel, N., Vendrell, D., De Blas, I., & Múezquiz, J. L. (2010). Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunology*, 3(4), 355–360. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.12>
- Peterman, M. A., & Posadas, B. C. (2019). Direct economic impact of fish diseases on the east mississippi catfish industry. *North American Journal of Aquaculture*, 81(3), 222–229. <https://doi.org/10.1002/naaq.10090>
- Petit, J., Bailey, E. C., Wheeler, R. T., Oliveira, C. A. F. D., Forlenza, M., & Wiegertjes, G. F. (2019). Studies into β -glucan recognition in fish suggests a key role for the C-Type lectin pathway. *Frontiers in Immunology*, 10(FEB), 432709. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00280/>
- Piazzon, M. C., Naya-Català, F., Perera, E., Palenzuela, O., Sitjà-Bobadilla, A., & Pérez-Sánchez, J. (2020). Genetic selection for growth drives differences in intestinal microbiota composition and parasite disease resistance in gilthead sea bream. *Microbiome* 2020 8:1, 8(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S40168-020-00922-W>
- Ramírez-Boscá, A., Navarro-López, V., Martínez-Andrés, A., Such, J., Francés, R., Horga de la Parte, J., & Asín-Llorca, M. (2015). Identification of bacterial DNA in the peripheral blood of patients with active psoriasis. *JAMA Dermatology*, 151(6), 670. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2014.5585>
- Ramirez, R. F., & Dixon, B. A. (2003). Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture*, 227(1–4), 417–426. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00520-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00520-9)
- Reyes-Becerril, M., Angulo, C., Angulo, M., & Esteban, M. Á. (2021). Probiotic properties of *Debaryomyces hansenii* BCS004 and their immunostimulatory effect in supplemented diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Research*, 52(6), 2715–2726. <https://doi.org/10.1111/ARE.15123>
- Ringø, E., Zhou, Z., Vecino, J. L. G., Wadsworth, S., Romero, J., Krogdahl, Å., Olsen, R. E., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Owen, M., Lauzon, H. L., Martinsen, L. L., De Schryver, P., Bossier, P., Sperstad, S., & Merrifield, D. L. (2016). Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquaculture Nutrition*, 22(2), 219–282. <https://doi.org/10.1111/anu.12346>
- Ringø, Einar, Myklebust, R., Mayhew, T. M., & Olsen, R. E. (2007). Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture*, 268(1-4), 251-264. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.047>
- Rooks, M. G., & Garrett, W. S. (2016). Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature Reviews Immunology*, 16(6), 341–352. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.42>
- Sadoul, B., & Geffroy, B. (2019). Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. *Journal of Fish Biology*, 94(4), 540–555. <https://doi.org/10.1111/JFB.13904>
- Safafar, H., Nørregaard, P. U., Ljubic, A., Møller, P., Holdt, S. L., & Jacobsen, C. (2016). Enhancement of protein and pigment content in two *Chlorella* species cultivated on industrial process water. *Journal of Marine Science and Engineering*, 4(4), 84. <https://doi.org/10.3390/jmse4040084>
- Salama, N. K. G., & Murray, A. G. (2011). Farm size as a factor in hydrodynamic transmission of pathogens in aquaculture fish production. *Aquaculture Environment Interactions*, 2(1), 61–74. <https://doi.org/10.3354/aei00030>

- Salinas, I., Abelli, L., Bertoni, F., Picchietti, S., Roque, A., Furones, D., Cuesta, A., Meseguer, J., & Esteban, M. Á. (2008). Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 25(1–2), 114–123. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2008.03.011>
- Salinas, I., Fernández-Montero, Á., Ding, Y., & Sunyer, J. O. (2021). Mucosal immunoglobulins of teleost fish: A decade of advances. In *Developmental and Comparative Immunology* 121, 104079. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104079>
- Samtiya, M., Aluko, R. E., & Dhewa, T. (2020). Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. *Food Production, Processing and Nutrition*, 2(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s43014-020-0020-5>
- Schar, D., Klein, E. Y., Laxminarayan, R., Gilbert, M., & Van Boeckel, T. P. (2020). Global trends in antimicrobial use in aquaculture. *Scientific Reports*, 10(1), 21878. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78849-3>
- Schrezenmeir, J., & De Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics - Approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 SUPPL.). <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.361s>
- Shija, V. M., Amoah, K., & Cai, J. (2023). Effect of *Bacillus* probiotics on the immunological responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A review. *Fishes* 8(7), 366. <https://doi.org/10.3390/FISHES8070366>
- Shripada, R., Gayatri, A. J., & Sanjay, P. (2020). Paraprobiotics. *Precision medicine for investigators, practitioners and providers*, 39–49.
- Siddik, M. A. B., Sørensen, M., Islam, S. M. M., Saha, N., Rahman, M. A., & Francis, D. S. (2024). Expanded utilisation of microalgae in global aquafeeds. *Reviews in Aquaculture* . 16(1) 6–33. <https://doi.org/10.1111/raq.12818>
- Siles, J. A., García-Sánchez, M., & Gómez-Brandón, M. (2021). Studying microbial communities through co-occurrence network analyses during processes of waste treatment and in organically amended soils: A review. *Microorganisms*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061165>
- Silva, D. M., Valente, L. M. P., Sousa-Pinto, I., Pereira, R., Pires, M. A., Seixas, F., & Rema, P. (2015). Evaluation of IMTA-produced seaweeds (*Gracilaria*, *Porphyra*, and *Ulva*) as dietary ingredients in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., juveniles. Effects on growth performance and gut histology. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1671–1680. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0453-9>
- Skopina, M. Y., Vasileva, A. A., Pershina, E. V., & Pinevich, A. V. (2016). Diversity at low abundance: The phenomenon of the rare bacterial biosphere. *Microbiology*, 85(3), 272–282. <https://doi.org/10.1134/S0026261716030139>
- Skrodenyte-Arbaciauskiene, V., Sruoga, A., & Butkauskas, D. (2006). Assessment of microbial diversity in the river trout *Salmo trutta fario* L. intestinal tract identified by partial 16S rRNA gene sequence analysis. *Fisheries Science*, 72(3), 597–602. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01189.x>
- Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, F., Román, L., Acosta, B., & Real, F. (2009). *Uso de probióticos en Acuicultura*. 51. <https://accedacris.ulpgc.es/handle/10553/12399>
- Stentiford, G. D., Sritunyalucksana, K., Flegel, T. W., Williams, B. A. P., Withyachumnarnkul, B., Itsathitphaisarn, O., & Bass, D. (2017). New paradigms to help solve the global aquaculture disease crisis. *PLoS Pathogens*, 13(2), e1006160. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006160>

- Stolfi, C., Maresca, C., Monteleone, G., & Laudisi, F. (2022). Implication of intestinal barrier dysfunction in gut dysbiosis and diseases. *Biomedicines*, 10(2), 289. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020289>
- Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2015). Feed matters: satisfying the feed demand of aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/23308249.2014.987209>
- Tapia-Paniagua, S. T., Vidal, S., Lobo, C., García de la Banda, I., Esteban, M. A., Balebona, M. C., & Moriñigo, M. A. (2015). Dietary administration of the probiotic SpPdp11: Effects on the intestinal microbiota and immune-related gene expression of farmed *Solea senegalensis* treated with oxytetracycline. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(2), 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.07.007>
- Tapia-Paniagua, S. T., Vidal, S., Lobo, C., Prieto-Álamo, M. J., Jurado, J., Cordero, H., Cerezuela, R., García de la Banda, I., Esteban, M. A., Balebona, M. C., & Moriñigo, M. A. (2014). The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease. *Fish and Shellfish Immunology*, 41(2), 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.019>
- Tapia-Paniagua, Silvana Teresa, Chabrilón, M., Díaz-Rosales, P., de la Banda, I. G., Lobo, C., Balebona, M. C., & Moriñigo, M. A. (2010). Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbial Ecology*, 60(2), 310–319. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9680-z>
- Taverniti, V., & Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: Proposal of paraprobiotic concept). *Genes and Nutrition*, 6(3), 261–274. <https://doi.org/10.1007/S12263-011-0218-X/>
- Theodorou, J. A., Perdikaris, C., & Filippopoulos, N. G. (2015). Evolution through innovation in aquaculture: a critical review of the greek mariculture industry. *Journal of Applied Aquaculture*, 27(2), 160–181. <https://doi.org/10.1080/10454438.2015.1049473>
- Tinh, N. T. N., Dierckens, K., Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2008). A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Marine Biotechnology*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9054-9>
- Tripathy, P. S., Khatei, A., & Parhi, J. (2022). Omics in Aquaculture. In *Advances in Fisheries Biotechnology* (83–94). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-16-3215-0_5
- Vadassery, D. H., & Pillai, D. (2020). Quorum quenching potential of *Enterococcus faecium* QQ12 isolated from gastrointestinal tract of *Oreochromis niloticus* and its application as a probiotic for the control of *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus 1758). *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(3), 1333–1343. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00230-3>
- Vidal, S., Tapia-Paniagua, S. T., Mori, M., Nigo, ~, Lobo, C., Es, I., De La Banda, G., Del Carmen Balebona, M., & Mori, M. A. (2016). Effects on intestinal microbiota and immune genes of *Solea senegalensis* after suspension of the administration of *Shewanella putrefaciens* Pdp11. *Fish & Shellfish Immunology* 58, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.010>
- Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., & Drider, D. (2019). Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in Microbiology*, 10, 422285. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>

- Vijayaram, S., & Kannan, S. (2018). Probiotics: The marvelous factor and health benefits. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*, 2(1), 1. https://doi.org/10.4103/bbrj.bbrj_87_17
- Vizcaíno, A. J., Fumanal, M., Sáez, M. I., Martínez, T. F., Moriñigo, M. A., Fernández-Díaz, C., Anguis, V., Balebona, M. C., & Alarcón, F. J. (2019). Evaluation of *Ulva ohnoi* as functional dietary ingredient in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Effects on the structure and functionality of the intestinal mucosa. *Algal Research*, 42, 101608. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2019.101608>
- Vizcaíno, A J, López, G., Sáez, M. I., Jiménez, J. A., Barros, A., Hidalgo, L., Camacho-Rodríguez, J., Martínez, T. F., Cerón-García, M. C., & Alarcón, F. J. (2014). Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Aquaculture*, 431, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.010>
- Vizcaíno, A J, Rodiles, A., López, G., Sáez, M. I., Herrera, M., Hachero, I., Martínez, T. F., Cerón-García, M. C., & Alarcón, F. J. (2018). Growth performance, body composition, and digestive functionality of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles fed diets including microalgae freeze-dried biomass. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(2), 661–677. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0462-8>
- Vizcaíno, Antonio Jesús, Mendes, S. I., Varela, J. L., Ruiz-Jarabo, I., Rico, R., Figueroa, F. L., Abdala, R., Moriñigo, M. Á., Mancera, J. M., & Alarcón, F. J. (2016). Growth, tissue metabolites and digestive functionality in *Sparus aurata* juveniles fed different levels of macroalgae, *Gracilaria cornea* and *Ulva rigida*. *Aquaculture Research*, 47(10), 3224–3238. <https://doi.org/10.1111/are.12774>
- Wan, A. H. L., Davies, S. J., Soler-Vila, A., Fitzgerald, R., & Johnson, M. P. (2019). Macroalgae as a sustainable aquafeed ingredient. *Reviews in Aquaculture* 11(3), 458–492. <https://doi.org/10.1111/raq.12241>
- Wang, A. R., Ran, C., Ringø, E., & Zhou, Z. G. (2018). Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 626–640. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12191>
- Wang, E., Wang, K., Chen, D., Wang, J., He, Y., Long, B., Yang, L., Yang, Q., Geng, Y., Huang, X., Ouyang, P., & Lai, W. (2015). Evaluation and selection of appropriate reference genes for real-time quantitative PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during vaccination and infection. *Int. J. Mol. Sci*, 16, 9998–10015. <https://doi.org/10.3390/ijms16059998>
- Wang, Y. B., Li, J. R., & Lin, J. (2008). Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture*, 281(1–4), 1–4. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2008.06.002>
- Wells, M. L., Potin, P., Craigie, J. S., Raven, J. A., Merchant, S. S., Helliwell, K. E., Smith, A. G., Camire, M. E., & Brawley, S. H. (2016). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology* 2016 29:2, 29(2), 949–982. <https://doi.org/10.1007/S10811-016-0974-5>
- Wu, X., Teame, T., Hao, Q., Ding, Q., Liu, H., Ran, C., Yang, Y., Zhang, Y., Zhou, Z., Duan, M., & Zhang, Z. (2020). Use of a paraprobiotic and postbiotic feed supplement (HWF™) improves the growth performance, composition and function of gut microbiota in hybrid sturgeon (*Acipenser baerii* x *Acipenser schrenckii*). *Fish and Shellfish Immunology*, 104, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.054>
- Xia, X., Lu, J., Chen, X., Zhou, L., Huang, Y., Ding, S., & Li, G. (2024). Impact of whole grain highland hull-less barley on the denaturing gradient gel electrophoresis profiles of gut microbial communities in rats fed high-fat diets. *Microbiology Spectrum*. <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.04089-23>

- Xia, Y., Wang, M., Gao, F., Lu, M., & Chen, G. (2020). Effects of dietary probiotic supplementation on the growth, gut health and disease resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Nutrition*, 6(1), 69–79. <https://doi.org/10.1016/J.ANINU.2019.07.002>
- Xu, D. H., Moreira, G. S. A., Shoemaker, C. A., Zhang, D., & Beck, B. H. (2017). Expression of immune genes in systemic and mucosal immune tissues of channel catfish vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 66, 540–547. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2017.05.051>
- Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M., & Takriff, M. S. (2014). An overview: Biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research* 21(1). <https://doi.org/10.1186/2241-5793-21-6>
- Yang, Liang, Balakrishnan, Belobrajdic, Feng, & Zhang. (2020). Role of dietary nutrients in the modulation of gut microbiota: a narrative review. *Nutrients*, 12(2), 381. <https://doi.org/10.3390/nu12020381>
- Yukgehnaish, K., Kumar, P., Sivachandran, P., Marimuthu, K., Arshad, A., Paray, B. A., & Arockiaraj, J. (2020). Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1903–1927. <https://doi.org/10.1111/raq.12416>
- Zhang, J., Guo, X., Han, Z., Qu, L., Xia, T., Chen, X., Xu, J., Ding, Z., Wei, C., & Cheng, H. (2023). Comparative analysis of hepatopancreas RNA-seq of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed different starch diets. *Fishes*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/fishes8100495>
- Zhang, Y., Lu, R., Qin, C., & Nie, G. (2020). Precision nutritional regulation and aquaculture. *Aquaculture Reports* 18, 2352–5134. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100496>
- Zhao, Z., Zhang, X., Zhao, F., Zhou, Z., Zhao, F., Wang, J., Liu, T., Yang, X., Zhang, X., & Li, Z. (2022). Stress responses of the intestinal digestion, antioxidant status, microbiota and non-specific immunity in Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio* L.) under starvation. *Fish and Shellfish Immunology*, 120, 411–420. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.12.008>
- Zorriehzahra, M. J., Delshad, S. T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., & Lazado, C. C. (2016). Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Veterinary Quarterly*, 36(4), 228–241. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1172132>

Hipótesis y objetivos





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Hipótesis

En los últimos años, los sistemas de producción acuícola se han intensificado, al mismo tiempo que ha ganado prioridad la gestión de la salud y el bienestar de los animales. Dado el papel fundamental de la dieta en la nutrición, el desarrollo del animal y la protección frente a patógenos, el diseño de nuevas dietas funcionales se plantea como una alternativa para mejorar la producción acuícola. Algas y bacterias poseen gran variedad de compuestos bioactivos, tales como ácidos grasos, vitaminas, antioxidantes y enzimas, lo que sugiere que su incorporación como fuente adicional de nutrientes podría beneficiar significativamente a los organismos acuáticos.

La microbiota posee una función relevante en el estado de salud y bienestar de su huésped, y se ve directamente influenciada tanto por las condiciones ambientales que rodean al individuo, como por la dieta. Evaluar el impacto de estos factores sobre los microorganismos que la componen, se convierte en un tema de estudio de relevancia cuando se van a incorporar nuevos componentes dietéticos.

Cada vez hay más estudios que indican el posible beneficio del uso de microorganismos y algas como parte de las dietas funcionales. En este estudio se plantea la siguiente hipótesis:

La aplicación de dietas funcionales que contengan algas o bacterias como aditivos puede tener efecto sobre la microbiota y la interacción microbiota-hospedador en peces de interés comercial.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Objetivos

Para validar la hipótesis planteada se formulan los siguientes objetivos y subobjetivos científicos:

Objetivo 1. Evaluar la influencia del empleo de dietas funcionales sobre la microbiota y la integridad de las mucosas en ejemplares de dorada (*Sparus aurata*).

Subobjetivo 1.1: Estudiar la microbiota y expresión de genes implicados en la barrera intestinal de doradas alimentadas con una dieta suplementada con la microalga *Nannochloropsis gaditana*.

Subobjetivo 1.2.: Analizar las interacciones de las comunidades microbianas presentes en la piel y branquias de *S. aurata* tras la administración de una dieta suplementada con *Nannochloropsis* sp. y *Arthrospira* sp.

Subobjetivo 1.3. Estudiar la microbiota y la respuesta transcriptómica de la piel dañada de *S. aurata* tras la administración de una dieta adicionada con el probiótico *Shewanella putrefaciens* SpPdp11.

Objetivo 2. Determinar el efecto de dietas funcionales en la microbiota y expresión de genes en el intestino de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*).

Subobjetivo 2.1: Evaluar el efecto de la alimentación con una dieta suplementada con la macroalga *Ulva ohnoi* sobre la microbiota intestinal de *S. senegalensis*.

Subobjetivo 2.2: Estudiar el efecto de la aplicación, como paraprobiótico, del probiótico *S. putrefaciens* SpPdp11 sobre la microbiota y la respuesta transcriptómica intestinal de ejemplares de *S. senegalensis*



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Capítulo 1



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Efectos de una dieta suplementada con la microalga *Nannochloropsis gaditana* sobre la microbiota y expresión de genes implicados en la barrera intestinal de doradas

Resumen

El uso de microalgas hidrolizadas en la dieta de peces carnívoros puede aumentar la biodisponibilidad de proteínas y compuestos bioactivos en el tracto digestivo, como ácidos grasos insaturados o vitaminas. Se trata de moléculas esenciales para el adecuado desarrollo fisiológico de los peces en acuicultura. Sin embargo, algunos componentes antinutricionales y otras moléculas indeseables también pueden ser liberados por las microalgas aportadas, comprometiendo la integridad del intestino. La inclusión de pequeñas cantidades de microalgas hidrolizadas en la dieta de los peces, puede ser una buena estrategia para evitar efectos negativos, mejorando la disponibilidad de compuestos beneficiosos. *Nannochloropsis gaditana* es una microalga interesante ya que se considera nutracéutica. Estudios anteriores reportaron efectos beneficiosos tras su inclusión en la dieta de *Sparus aurata*, una especie ampliamente cultivada en Europa y en todos los países mediterráneos. Sin embargo, la administración de microalgas crudas puede producir inflamación intestinal, aumento de la permeabilidad intestinal, translocación bacteriana y alteración de los procesos de digestión y absorción. El objetivo de este estudio fue evaluar los cambios en la microbiota y la estabilidad de la barrera intestinal de ejemplares de *S. aurata* alimentados con una baja inclusión (5%) de *N. gaditana* hidrolizada. La microbiota intestinal se analizó utilizando la tecnología Illumina MiSeq y se construyeron librerías utilizando las regiones variables V3-V4 de ADNr 16S. Los análisis se basaron en la identificación, cuantificación y comparación de secuencias. Se realizó un estudio predictivo de la funcionalidad microbiana intestinal con el programa PICRUSt (*Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*). Los resultados determinaron que la composición bacteriana intestinal y la funcionalidad predicha de esta microbiota no se modificó estadísticamente después de la inclusión de *N. gaditana* en la dieta. El estudio de la expresión génica demostró que los genes implicados en la permeabilidad e integridad

intestinal no se alteraron en los peces tratados con la dieta experimental. Por lo que tanto la potencial funcionalidad, la composición taxonómica bacteriana de la microbiota intestinal, así como la expresión de genes de integridad y permeabilidad en el intestino del pez carnívoro *S. aurata*, no se vieron afectadas por la inclusión de microalga *N. gaditana* hidrolizada al 5%.

1. Introducción

La investigación y la mejora de las dietas comerciales son cruciales en la acuicultura. La búsqueda de nuevos productos sostenibles y la necesidad de proporcionar un mejor estado de salud a los organismos acuícolas son prioridades medioambientales (Thilsted y col., 2016). Con el objetivo de asegurar un desarrollo óptimo o producir un efecto beneficioso sobre ellos, actualmente se están desarrollando nuevas dietas funcionales en la industria acuícola (Bae y col., 2020; Gaber, 2006; Thilsted y col., 2016; Won y col., 2017).

Algunas estrategias se han centrado en la administración de probióticos, prebióticos, simbióticos, postbióticos (Amenyogbe y col., 2020), o en los compuestos bioactivos (Beltrán y col., 2018; Gisbert y col., 2017; Silveira Júnior y col., 2019). Los compuestos bioactivos son sustancias de origen natural con alto valor biológico, comúnmente encontradas en plantas terrestres (Bulfon y col., 2015) y algas (Almendinger y col., 2021; Michalak y Chojnacka, 2015), que son ricos en proteínas, aminoácidos esenciales y ácidos grasos poliinsaturados (Herrero y col., 2012). Los compuestos nutracéuticos suelen ejercer efectos inmunomoduladores y promotores del crecimiento (Chakraborty y col., 2014; Chi y col., 2016; Hoseinifar y col., 2018), razones por las que su uso se ha propuesto como una fuerte estrategia preventiva contra infecciones oportunistas en la industria de la acuicultura y para mejorar la producción de peces cultivados (Elumalai y col., 2020).

Varios géneros de microalgas también son fuentes importantes de compuestos bioactivos, como esteroides, proteínas, enzimas, pigmentos o vitaminas (Xu y col., 2011; Xuan y col., 2013; Younis y col., 2018). Un ejemplo es *Nannochloropsis*, un género de microalgas oleaginosas considerado un candidato óptimo para aplicaciones comerciales (Li y col., 2014). Específicamente, *N. gaditana* (Lubian, 1982) es un alga prometedora para su uso en acuicultura, ya que tiene una gran eficiencia fotosintética y fija altas cantidades de dióxido de carbono en forma de lípidos, como omega-3 (Ryckebosch y col., 2014), ácido eicosapentaenoico (EPA,

C20:5n-3) (Camacho-Rodríguez y col., 2014) y ácido docosahexaenoico (DHA, C22: 6n-3) (Bigogno y col., 2002). Además, es una excelente fuente de pigmentos (Lubián y col., 2000) y contiene aminoácidos y compuestos antioxidantes (Millao y Uquiche, 2016). Su producción no es costosa (Camacho-Rodríguez y col., 2014) y se ha utilizado para alimentar peces, especialmente en sus estadios larvarios (Jorge y col., 2019).

Sin embargo, cuando las algas se incorporan al alimento, la presencia de una pared celular con celulosa puede reducir la biodisponibilidad *in vivo* de nutrientes y otros compuestos intracelulares (Li y col., 2020; Matos y col., 2019). Esta inaccesibilidad de nutrientes puede ocultar los resultados positivos esperados en los organismos. Hay tratamientos enzimáticos, químicos, físicos y mecánicos para alterar la pared celular de las algas y liberar sus componentes intracelulares (Lee y col., 2012; Mendes-Pinto y col., 2001; Yap y col., 2015). A pesar de que generalmente se prefieren los procedimientos físicos, porque proporcionan una mayor digestibilidad manteniendo la composición inalterada, los métodos enzimáticos se han probado con éxito en peces de cultivo, ya que utilizan enzimas con actividad celulasa (Vizcaíno, Sáez, y col., 2019). En particular, la hidrólisis enzimática de la pared celular de las microalgas puede ser una buena opción, ya que este proceso ocurre bajo temperaturas suaves y reduce las posibilidades de inhibir la liberación de subproductos (Mahdy y col., 2014). Sin embargo, el proceso de hidrólisis enzimática de la pared celular implica el riesgo de liberar sustancias intracelulares que pueden provocar alteraciones fisiológicas indeseables en los peces (Zhang y col., 2013). La liberación de moléculas a partir de la lisis celular, puede afectar a la composición y la funcionalidad de la microbiota intestinal, o aumentar la inflamación, la permeabilidad intestinal o la translocación bacteriana en el intestino (Torrecillas y col., 2021). Por ejemplo, algunas especies de microalgas contienen lectinas, que se consideran elementos antinutricionales (Alarcón y col., 1999; Sathasivam y col., 2019). Sin embargo, en juveniles de dorada (*Sparus aurata*) alimentados con dietas suplementadas con hidrolizados enzimáticos de *Arthrospira* (2% y 4%), destacaron efectos beneficiosos al describir un aumento en las actividades de enzimas digestivas como la tripsina, la leucina aminopeptidasa o la fosfatasa alcalina; mejorando los procesos digestivos y la capacidad de absorción intestinal (Galafat y col., 2020). Una baja inclusión de *N. gaditana* en *S. aurata* mostró ser suficiente para obtener un crecimiento óptimo sin aumentar sustancialmente el costo del alimento (Ayala y col., 2020).

La capa mucosa y las estructuras intracelulares, conocidas como uniones estrechas, desempeñan un papel importante en la regulación del paso paracelular y la permeabilización de elementos lumenales, como nutrientes, moléculas tóxicas o agentes infecciosos a través de la barrera intestinal. En los peces, la permeabilidad y la integridad de esta barrera se ven particularmente afectadas por el estrés, los cambios en la microbiota, la presencia de patógenos, los cambios en la salinidad y la dieta (Sundh y Sundell, 2015). Sin embargo, aún no se han analizado los efectos de los hidrolizados de algas sobre la composición taxonómica y la funcionalidad de la microbiota intestinal, además de la estabilidad de la barrera intestinal. Esos dos aspectos están implicados en el proceso de digestión y absorción, y estrechamente relacionados con un estado saludable en peces. Por estos motivos, en este trabajo se ha abordado el análisis de la composición taxonómica y potencial funcionalidad de la microbiota intestinal, así como la determinación de la expresión de genes relacionados con la estabilidad de la barrera intestinal en ejemplares de *S. aurata* alimentados con una dieta con un bajo porcentaje de *N. gaditana* hidrolizada en su composición.

2. Material y métodos

2.1. Preparación del alimento

La biomasa de *N. gaditana* se produjo en fotobiorreactores tubulares cerrados en “La Estación Experimental de las Palmerillas” (Fundación Cajamar, Almería, España). Allí se recogió la pasta de microalgas crudas y seguidamente se hidrolizaron enzimáticamente de acuerdo con el protocolo descrito previamente por Galafat y col. (2020). Se hidrolizó biomasa de *N. gaditana*, que contenía hasta 150 g/L de microalgas crudas, utilizando enzimas comerciales con actividad celulasa (Viscozyme®) en condiciones controladas (pH 5,0 y 50 °C en agitación continua) durante 4 h, proporcionando 2% (p/p) de enzima. El pienso experimental (dieta FH) que incluía un 5% de algas hidrolizadas, se elaboró en las instalaciones del CEIA3-Universidad de Almería, en la Unidad de Dietas Experimentales (UDE). Las concentraciones de microalgas empleadas se basaron en estudios previos (Ayala y col., 2020). Los sólidos se mezclaron en una amasadora y, posteriormente, la mezcla resultante se extruyó para obtener gránulos con el diámetro deseado (2-3 mm). El alimento se almacenó a -20 °C hasta su uso. La composición del alimento de control (dieta Control) se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de ingredientes de las dietas experimentales utilizadas en el ensayo de alimentación. La dieta FH contiene un 5% de biomasa de algas crudas hidrolizadas

Ingredientes (g/kg peso seco)	Dieta Control	Dieta FH
Harina de pescado LT ^a	200	200
Harina de <i>N. gaditana</i> hidrolizada	-	50
Harina de calamar ^b	20	20
Hidrolizado de proteína de pescado ^c	10	10
Harina de <i>Krill</i> ^b	20	20
Harina de gluten ²	150	150
Proteína de soja concentrada ⁴	366	335
Aceite de pescado	114	105
Lecitina de soja	10	10
Maltodextrina	42	32
Lisina	12	12
Metionina	5	5
Cloruro de colina ^e	5	5
Premix de Vitaminas y minerales	20	20
Goma guano ^b	10	10
Alginato ^b	10	10
Proteína cruda (%)	47,7 ± 1,5	46,6 ± 0,8
Lípidos crudos (%)	17,2 ± 0,5	16,5 ± 0,0
Cenizas (%)	5,3 ± 0,3	5,4 ± 0,1

^aNorsildemel (Bergen, Noruega). ^bLifebioencapsulation (Almería, España). ^cSopropeche (Francia) (81% de proteína total, 8,8% de lípidos brutos). ^dDSM (Francia) (65% de proteína total, 8% de lípidos totales) ^eSigma-Aldrich (Madrid, España).

2.2. Diseño del experimento y muestreo

El ensayo de alimentación se realizó en los Servicios Centrales de Investigación en Cultivos Marinos (SCI-CM, CASEM, Universidad de Cádiz, Puerto Real, Cádiz, España; Instalaciones para la Cría, Suministro y Usuarios de Animales de Experimentación; Código Operativo Español REGA ES11028000312), bajo la supervisión de técnicos cualificados. En el ensayo, juveniles de dorada de

aproximadamente $17,08 \pm 0,38$ g y $10,2 \pm 0,1$ cm de longitud (media $\pm$ DE) se distribuyeron aleatoriamente en 6 tanques de 80 L de capacidad (N = 15 peces por tanque). El experimento se dividió en dos condiciones de alimentación diferentes, uno recibió la dieta control (dieta Control) y el otro recibió una dieta suplementada con 5% de pasta fresca hidrolizada de *N. gaditana* (dieta FH) durante 86 días. Al final del ensayo de crecimiento, los animales (en ayunas durante 12 h) fueron capturados con redes y profundamente anestesiados con 2-fenoxietanol (1 ml/l, Sigma-Aldrich 77699). Se tomaron muestras intestinales de siete peces por tratamiento (tres peces de un tanque, y dos peces de los otros dos tanques). Luego, cada tracto digestivo se dividió en dos secciones principales, anterior y posterior, y se mantuvo a -80 °C hasta su uso. Los peces restantes de cada tanque se emplearon en un estudio paralelo.

2.3. Extracción y secuenciación de ADN mediante tecnología Illumina Miseq

El ADN de ambas secciones intestinales se extrajo según el protocolo descrito por Martínez y col., (1998) basado en precipitación salina, con modificaciones (Tapia-Paniagua y col., 2010). Unos 50mg de las muestras se mezclaron con 300 μ L de tampón de resuspensión (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,01 M, EDTA 0,1 M, pH 8) y 300 μ L de tampón de lisis (Tris-HCl 0,1 M, EDTA 0,1 M, NaCl 0,01 M), 1% SDS, pH 8,0), invirtiendo suavemente el tubo para mezclar bien. Las muestras se trataron con 32 μ L de NaCl 6 M y proteinasa K (150 μ g/mL) a 55 °C durante 2 h, y lisozima (10 mg/mL) a temperatura ambiente. A continuación, se añadió NaCl 6 M para alcanzar una concentración final de 1,5 M. La solución se enfrió en hielo durante 10 minutos seguido de una centrifugación a 13 000 rpm durante 3 min. El sobrenadante transparente que contenía ADN genómico se transfirió a otro tubo que contenía un volumen igual de isopropanol. Los tubos se invirtieron suavemente varias veces. El ADN se sedimentó mediante centrifugación a 13 000 rpm durante 3 min. Luego se lavó el sedimento de ADN en etanol al 70%. El pellet de ADN seco se resuspendió en 100 μ l de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) y se almacenó a 4 °C. La calidad y la integridad del ADN se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con GelRed Nucleic Acid Stain 20 000x (InTRON Biotechnology, Seúl, Corea). La concentración se determinó utilizando un fluorómetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Alemania). El ADN se almacenó a -20 °C para su posterior procesamiento y se utilizaron 30 ng para análisis posteriores.

Las librerías de secuenciación fueron construidas por el Servicio de Ultrasecuenciación del Centro de Bioinnovación (Universidad de Málaga, España) utilizando la plataforma Illumina MiSeq. La secuenciación se llevó a cabo utilizando cebadores directos e inversos dirigidos a las regiones variables V3-V4 del gen ADNr 16S.

Se utilizó un flujo de trabajo basado en el programa MOTHUR (versión 1.39.5) para eliminar secuencias de adaptadores de Illumina y demultiplexación. Las lecturas se filtraron, eliminando lecturas de <80pb o >2000pb de longitud. Además, las secuencias singleton y las quimeras fueron descartadas por UCHIME (versión 4.2, <https://drive5.com/uchime>). Se eliminaron los amplicones de PCR no específicos. Las secuencias no quiméricas representativas restantes se sometieron a una asignación taxonómica en comparación con la base de datos Greengenes 16S (mayo de 2013), con una similitud del 97% y se agruparon en Unidades Taxonómicas Operativas (OTU).

Tras generar el perfil taxonómico de las muestras del microbioma, se realizó una comparación de los taxones presentes. El tamaño de los datos se normalizó al número mínimo de lecturas obtenidas en todas las muestras secuenciadas. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico R y la herramienta web MicrobiomeAnalyst (Dhariwal y col., 2017). Para determinar el nivel de profundidad de secuenciación, se obtuvieron curvas de rarefacción trazando el número de OTU observados frente al número de secuencias obtenidas, y se calculó el coeficiente de cobertura de Good. La diversidad alfa se estimó en base a los índices de Shannon, Chao1 y Simpson, con el fin de analizar la diversidad y la dominancia de las comunidades microbianas presentes. Los resultados se presentaron a nivel taxonómico de filo, familia y género. El sumatorio de los taxones con abundancia relativa inferior al 1% ha sido considerado como grupo “ETC”. Este límite se define en función de los niveles que pueden detectarse con técnicas dependientes de PCR (Pedrós-Alió, 2006) y ha sido utilizado por ser el límite de detección en técnicas moleculares como la DGGE, utilizadas en el pasado para estudiar la microbiota intestinal (Muyzer y col., 1993; Tapia-Paniagua y col., 2010, 2014, 2015). Las diferencias entre abundancias e índices se analizaron mediante la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis con el programa estadístico XLSTAT, considerándose estadísticamente significativas aquellas con un valor de $p < 0,05$. Además, se llevó a cabo un análisis entre las distancias de las Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) mediante el análisis de coordenadas principales

(PCoA), utilizando la métrica de Bray Curtis, para visualizar las diferencias existentes en las muestras de microbiota de cada grupo experimental.

2.4. Perfil funcional de comunidades microbianas

Las funciones de la microbiota se estimaron de forma predictiva utilizando el programa PICRUSt (versión 1.1.3), una herramienta diseñada para inferir las funciones de los grupos bacterianos asignados a partir de los datos de abundancia de la secuenciación por amplicón ADNr 16S (Langille y col., 2013). Se calcularon las puntuaciones del índice de taxones secuenciados más cercanos (NSTI) para evaluar la precisión de los metagenomas predichos, y estos se clasificaron según la base de datos de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG, Kanehisa y Goto, 2000). Se compararon los perfiles funcionales bacterianos según las distintas categorías KEGG (desde el nivel 1 al 3) y se utilizó el programa STAMP (Statistical Analysis of Metagenomics Profiles) para analizar la abundancia diferencial entre categorías funcionales según la sección intestinal y dieta ingerida, mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA) con un post hoc de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

2.5. Aislamiento de ARN y PCR cuantitativa (qPCR)

Para evaluar la expresión de ciertos genes en el tracto intestinal, se extrajo ARN de cada sección del intestino, siguiendo las instrucciones del fabricante de TRIsure™ (Bioline, Inglaterra). La cantidad de ARN se determinó en Qubit (Thermo Scientific) y la transcripción inversa se realizó utilizando el kit de síntesis de ADNc First Strand (Thermo Scientific) a partir de 500 ng de ARN total. Se empleó un microlitro de cada ADNc como plantilla en las qPCR para analizar la transcripción de cada gen. Se utilizaron cebadores específicos para la cuantificación de la expresión génica relativa de genes implicados en la permeabilidad e integridad intestinal, como cadherina 1 (*cdh1*), cadherina 17 (*cdh17*), claudina 12 (*cldn12*), claudina 15 (*cldn15*), vimentina (*vim*), integrina 6-β (*itgb6*), ocludina (*ocln*), tubulina (*tub*) y zonula occludens 1 (*zo1*); reacciones proinflamatorias y producción de mucinas, tales como factor de necrosis tumoral α (*tnf-α*), ciclooxigenasa 2 (*cox2*), mucina intestinal (*imuc*) y mucina 2 (*muc2*); y absorción de nutrientes, como el transportador de péptidos 1 (*pept1*) (Tabla suplementaria 1). Para la normalización, las muestras se analizaron en paralelo con dos genes de referencia, el factor de elongación 1α (*ef1α*) y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa ribosomal (*gadph*).

Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en un termociclador C1000 Touch™ (BioRad, España) con el módulo óptico CFX96™ (BioRad, España) para medir fluorescencia. Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado en placas de 96 pocillos en un volumen final de 10 µL. La mezcla contenía 5 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (PROMEGA), 0,5 µL de cebadores directos e inversos (10 µM), 1 µL de ADNc y 3 µL de agua libre de nucleasas. Para los genes de permeabilidad e integridad se utilizó una activación inicial de la polimerasa Taq a 95 °C por 3 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 s y 60 °C por 60 s. Para los genes inmunitarios y relacionados con mucinas (*tnf-α*, *cox2*, *imuc*, *muc2* y *pept1*), la RT-qPCR se realizó a 95 °C durante 10 min y 40 ciclos de 95 °C durante 10 s y 60 °C durante 20 s. Finalmente, en el caso de los genes de referencia (*ef1α* y *gadh*) las reacciones se incubaron a 90 °C por 5 min seguido de 40 ciclos de 95 °C por 10 s, 60 °C por 10 s y 72 °C por 15 s. Se consideraron negativos, los valores umbral de amplificación (Cq) superiores a 40. La expresión relativa del ARNm se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak y Schmittgen, 2001), normalizado con una media geométrica entre los dos genes de referencia y en relación con los valores de amplificación obtenidos en los peces del grupo control. Las secuencias de los cebadores utilizadas para analizar la expresión génica en *S. aurata* se obtuvieron de estudios previos (Cerezuela y col., 2013; Estruch y col., 2018; Pérez-Sánchez y col., 2015; Sundh y Sundell, 2015)

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa XLSTAT (versión 2014.5.03) (Addinsoft, Nueva York, NY, EE. UU.). Los resultados se muestran como el promedio de $2^{-\Delta\Delta Cq} \pm$ desviación estándar (DE). La normalidad y homogeneidad de los datos fueron evaluados previamente mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. La existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Control y FH, en los valores de amplificación del RT-qPCR, se determinó mediante ANOVA y aplicando la prueba post hoc de Tukey-Kramer. Cuando no se pudo asumir la normalidad de los datos, se transformaron logarítmicamente y se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas asumiendo $p < 0,05$.

2.6. Declaración del comité de ética

El experimento *in vivo* se desarrolló en la Universidad de Cádiz (España). Los peces se mantuvieron y manipularon siguiendo las directrices para procedimientos experimentales en investigación con animales del Comité de

Ética y Bienestar Animal de la Universidad de Cádiz, según la legislación española (RD53/2013) y de la Unión Europea (2012/707/UE). El Comité Ético de la Junta de Andalucía aprobó los experimentos (número de referencia Junta de Andalucía 01/04/2019/047).

2.7. Disponibilidad de datos

Las lecturas secuenciadas sin procesar del gen ADNr 16S de la microbiota intestinal de *S. aurata* de este estudio están disponibles públicamente en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) dentro del bioproyecto PRJNA700500, con los números de acceso a las muestras, que va de la SAMN17721432 a la SAMN17721459.

3. Resultados

3.1. Análisis de los datos de la secuenciación

La secuenciación de Illumina MiSeq arrojó un total de 22 605 600 lecturas. Después del procesamiento bioinformático, se obtuvieron un total de $74\,653,78 \pm 9\,905,93$ lecturas por muestra y se clasificaron en 261 OTU. El tamaño de los datos se normalizó a 53 370 lecturas, lo que corresponde al número mínimo de lecturas obtenidas en todas las muestras. Las secuencias se filtraron a través de las curvas de rarefacción a 53 370 lecturas (Figura 1), dejando así 245 OTU. La cobertura de los índices de Good fue $\geq 99\%$ en todos los casos.

Se calcularon el número medio de OTU y los índices Chao1, Shannon y Simpson para cada muestra de grupos experimentales (Tabla 2). Los valores de diversidad alfa en los dos grupos experimentales y secciones ensayadas no mostraron diferencias significativas entre el tratamiento Control A y FH A o Control P y FH P ($p > 0,05$), donde “A” significa “sección anterior” y “P” “sección posterior” del intestino.

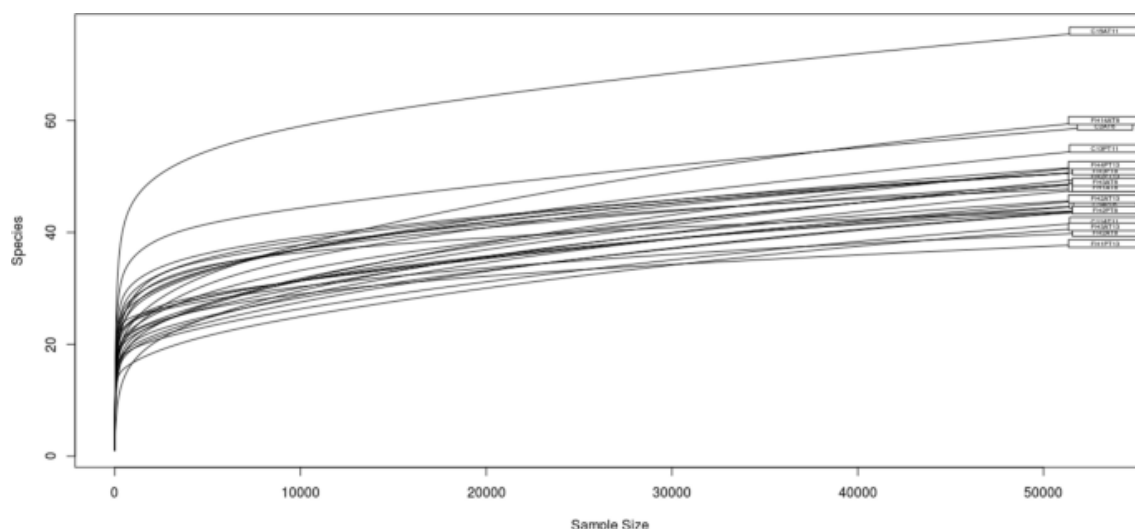


Figura 1. Curvas de rarefacción por individuo. Las secuencias se estandarizaron a 53 370 lecturas para igualar tamaños de muestra para comparación directa.

Tabla 2. Índices de diversidad alfa de comunidades bacterianas en las secciones intestinales anterior (A) y posterior (P) de *S. aurata* alimentadas con dietas control (Control) y *N. gaditana* (FH). Se representaron los valores medios y la desviación estándar.

Índices	Chao1	Shannon	Simpson	Cobertura de Good (%)
Control A	70,50 ± 19,28	2,75 ± 0,26	0,89 ± 0,02	99,98 ± 0,005
Control P	68,15 ± 18,13	2,47 ± 0,25	0,80 ± 0,03	99,99 ± 0,001
FH A	58,75 ± 11,85	2,12 ± 0,45	0,87 ± 0,11	99,98 ± 0,007
FH P	65,75 ± 13,74	2,54 ± 0,21	0,88 ± 0,02	99,99 ± 0,004

3.2. Composición taxonómica de la microbiota intestinal

El filo predominante detectado en todos los peces alimentados con las dos dietas fue *Proteobacteria*, seguido de *Firmicutes*, *Cyanobacteria* y *Actinobacteria*, y aunque la abundancia de los mismos fue ligeramente diferente en función de la dieta administrada, no se encontraron diferencias significativas entre dietas o secciones intestinales (Figura 2).

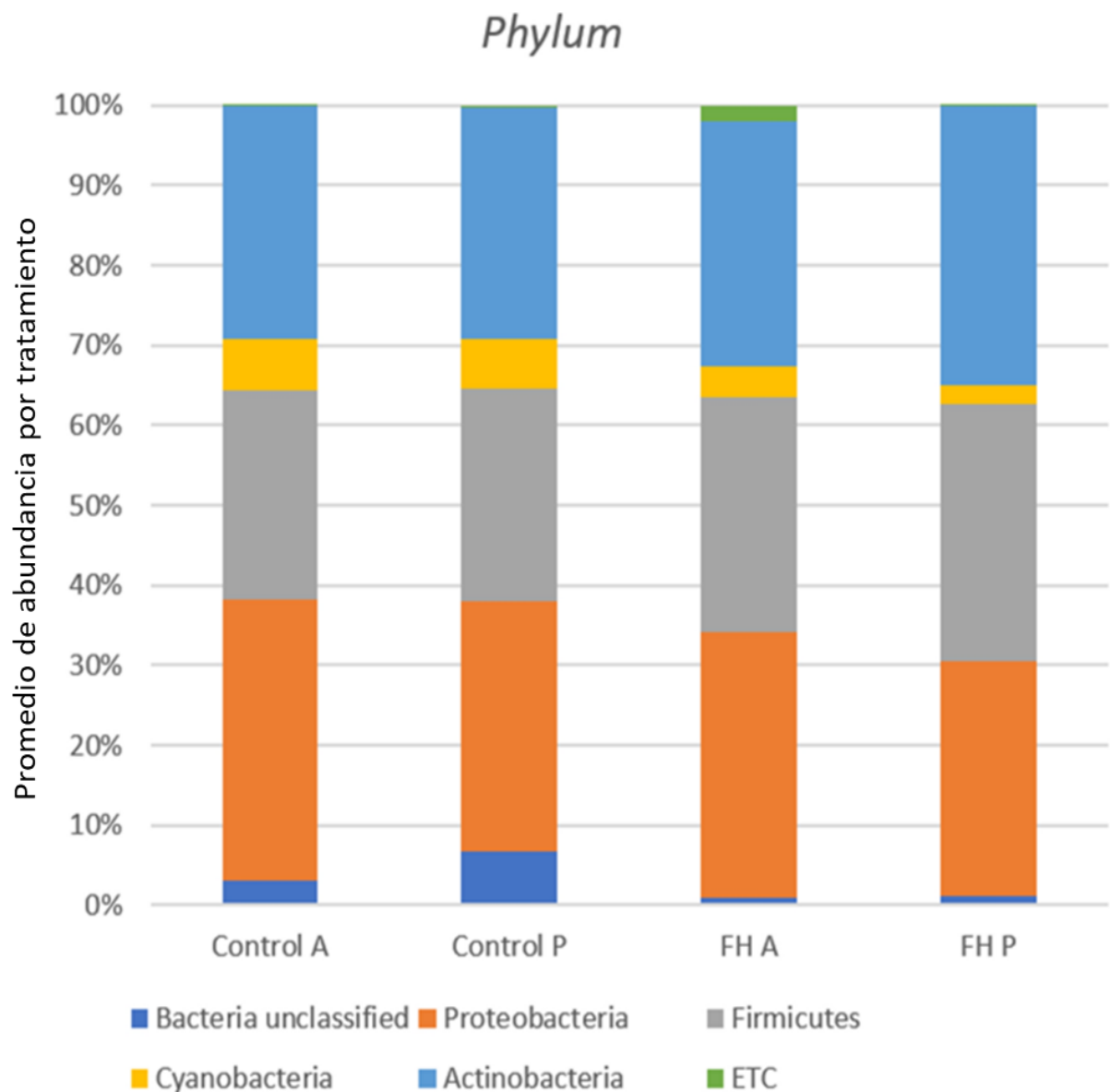
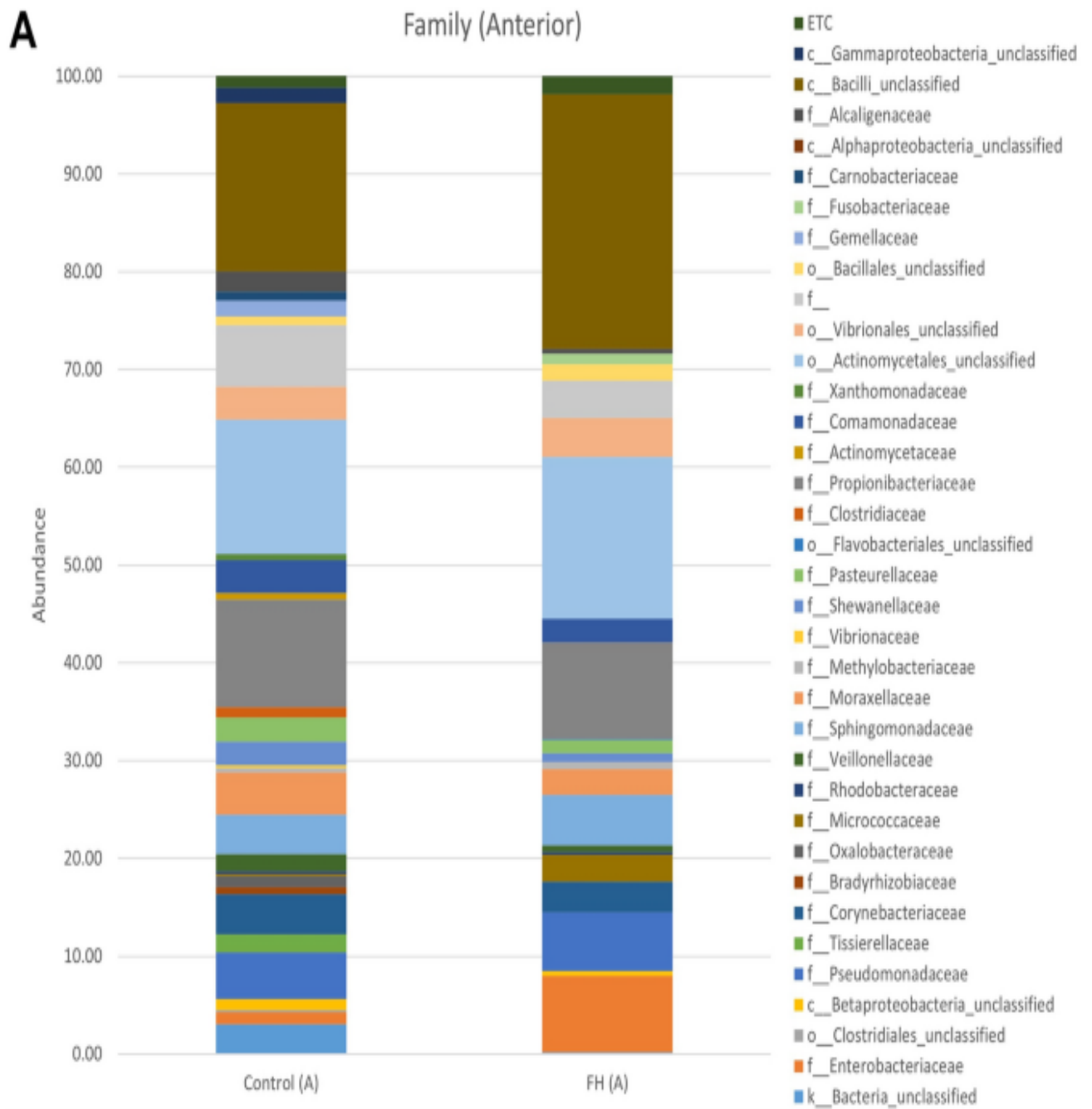


Figura 2. Comparación entre las comunidades microbianas a nivel de filo obtenidas para cada dieta, calculadas a partir de los promedios para cada grupo. El Control A y el Control P se refieren a la dieta de Control en las secciones anterior (A) y posterior (P) del intestino. FH A y FH P se refieren a la dieta suplementada con un 5% *N. gaditana* hidrolizada en las secciones anterior y posterior del intestino. ETC: sumatorio de filos cuya abundancia relativa fue < 1%.

Las familias encontradas en la sección anterior de la microbiota de los especímenes de estudio fueron heterogéneas. En esta sección del intestino, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Fusobacteriaceae*, así como *Actinomycetales*, *Vibrionales* y *Bacilli*, que no fueron identificadas a nivel de familia, aumentaron sus valores promedio en FH A en comparación con Control A, pero no significativamente. *Clostridiaceae*, *Gemellaceae*, *Carnobacteriaceae* y *Tissierellaceae* no estuvieron presentes en el tratamiento FH A, pero sí en el Control A. *Fusobacteriaceae* no estuvo presente en el Control A pero aparece en FH A (Figura 3A). En la sección posterior, *Moraxellaceae*, *Vibrionaceae*, *Actinomycetales* y *Bacilli_unclassified* aumentaron, pero *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae* disminuyeron en FH P. La familia *Carnobacteriaceae* y el orden *Clostridiales* desaparecieron en el tratamiento FH P (Figura 3B). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso y se han representado datos para mostrar la variación entre tratamientos.

Se realizó el análisis de géneros para cada dieta. En la sección anterior, se detectaron algunos géneros como *Clostridiales* o *Anaerococcus* en el Control A, pero no en el grupo FH A (Figura 4A). En la sección posterior *Enhidrobacter*, *Actinomycetales* o *Bacilli_unclassified* aumentaron sus valores promedio en el tratamiento FH P, pero *Vibrio* y *Sphingomonas* disminuyeron en este grupo (Figura 4B).



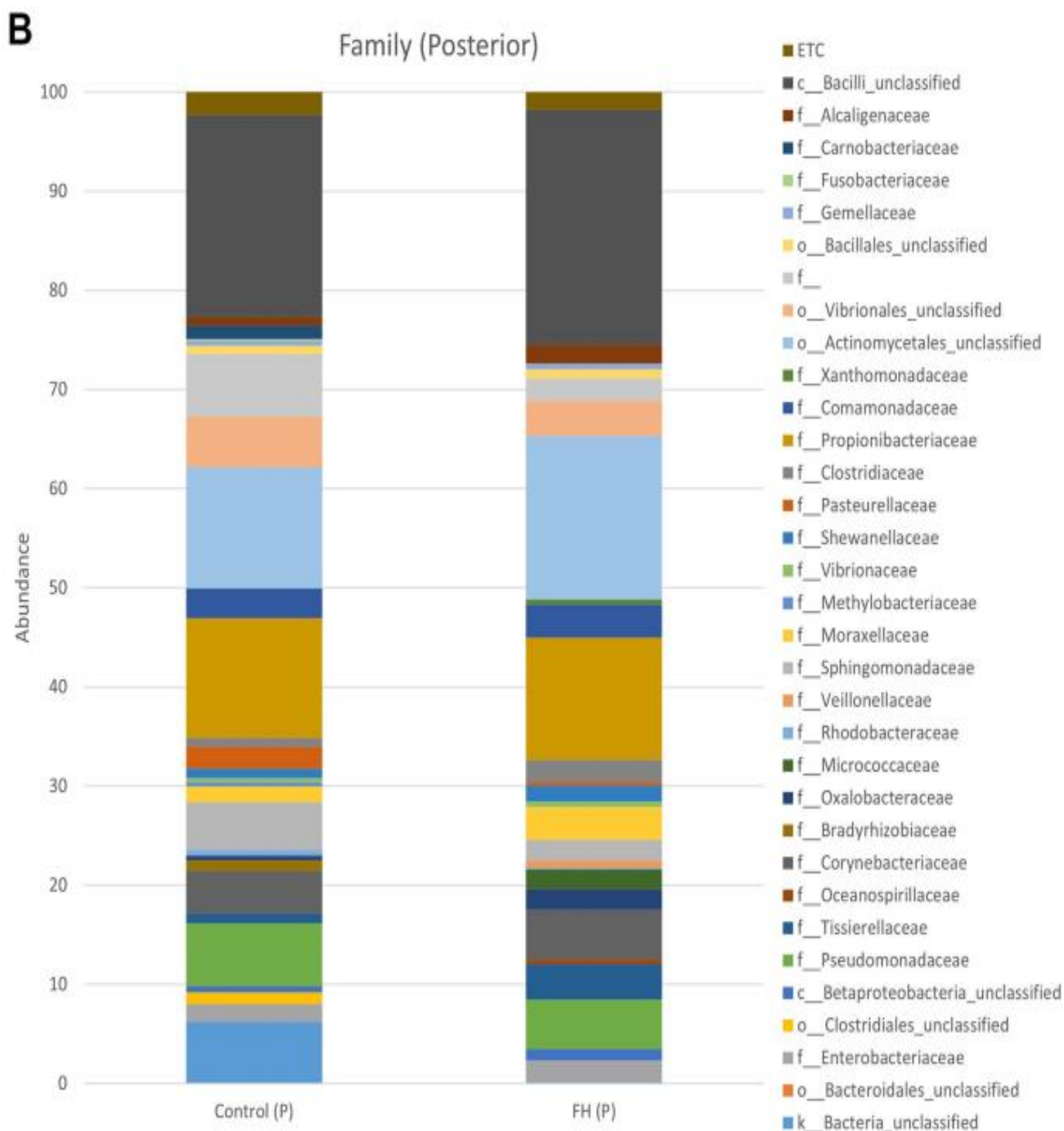
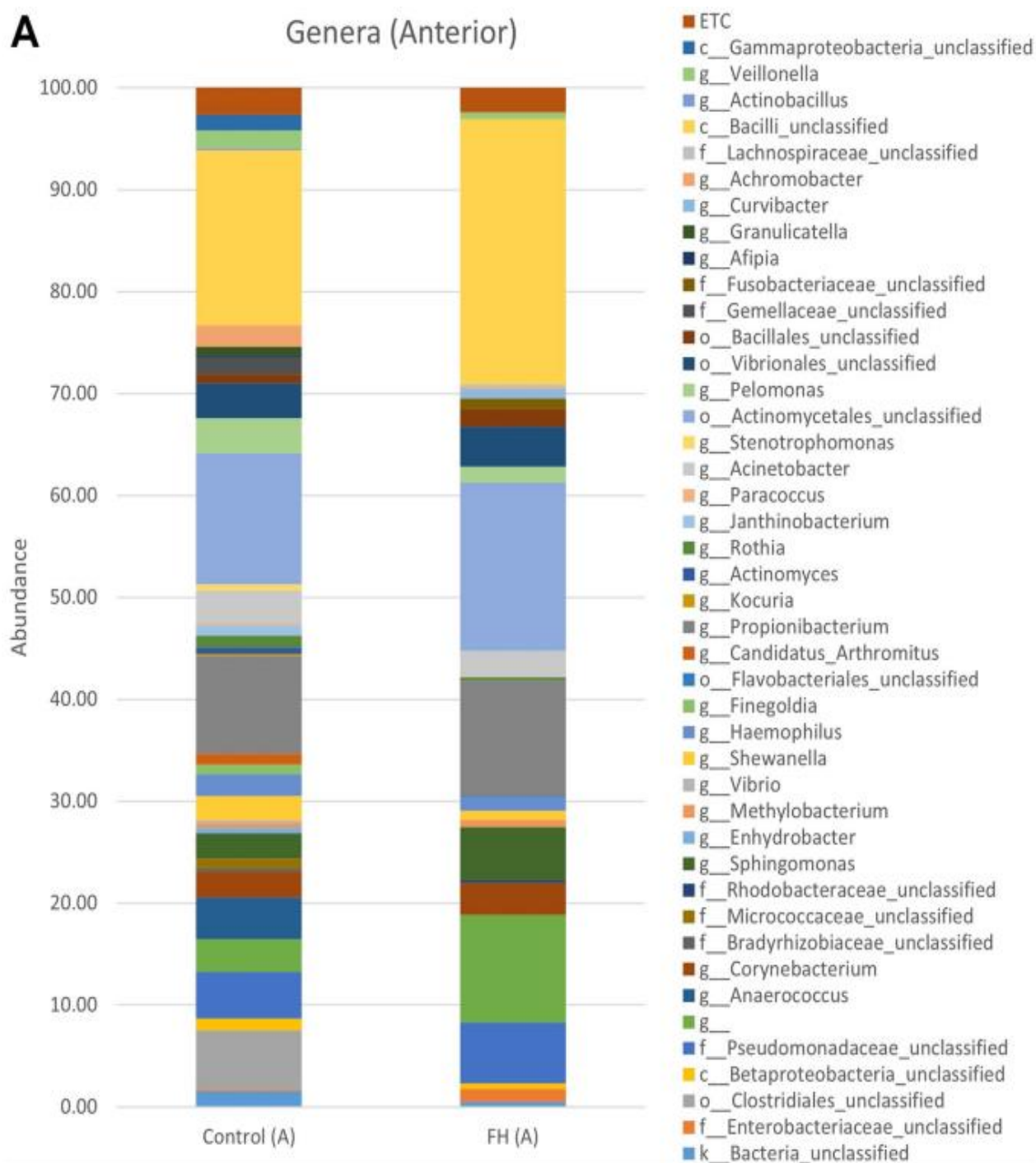


Figura 3. Comparación entre las comunidades microbianas a nivel de familia obtenidas para cada dieta, calculadas a partir de los promedios (%) para cada grupo. El Control A y el Control P se refieren a la dieta de Control en las secciones anterior (A) y posterior (P) del intestino. FH A y FH P se refieren a la dieta suplementada con un 5% *N. gaditana* hidrolizada en las secciones anterior y posterior del intestino. ETC: sumatorio de filos cuya abundancia relativa fue < 1%.



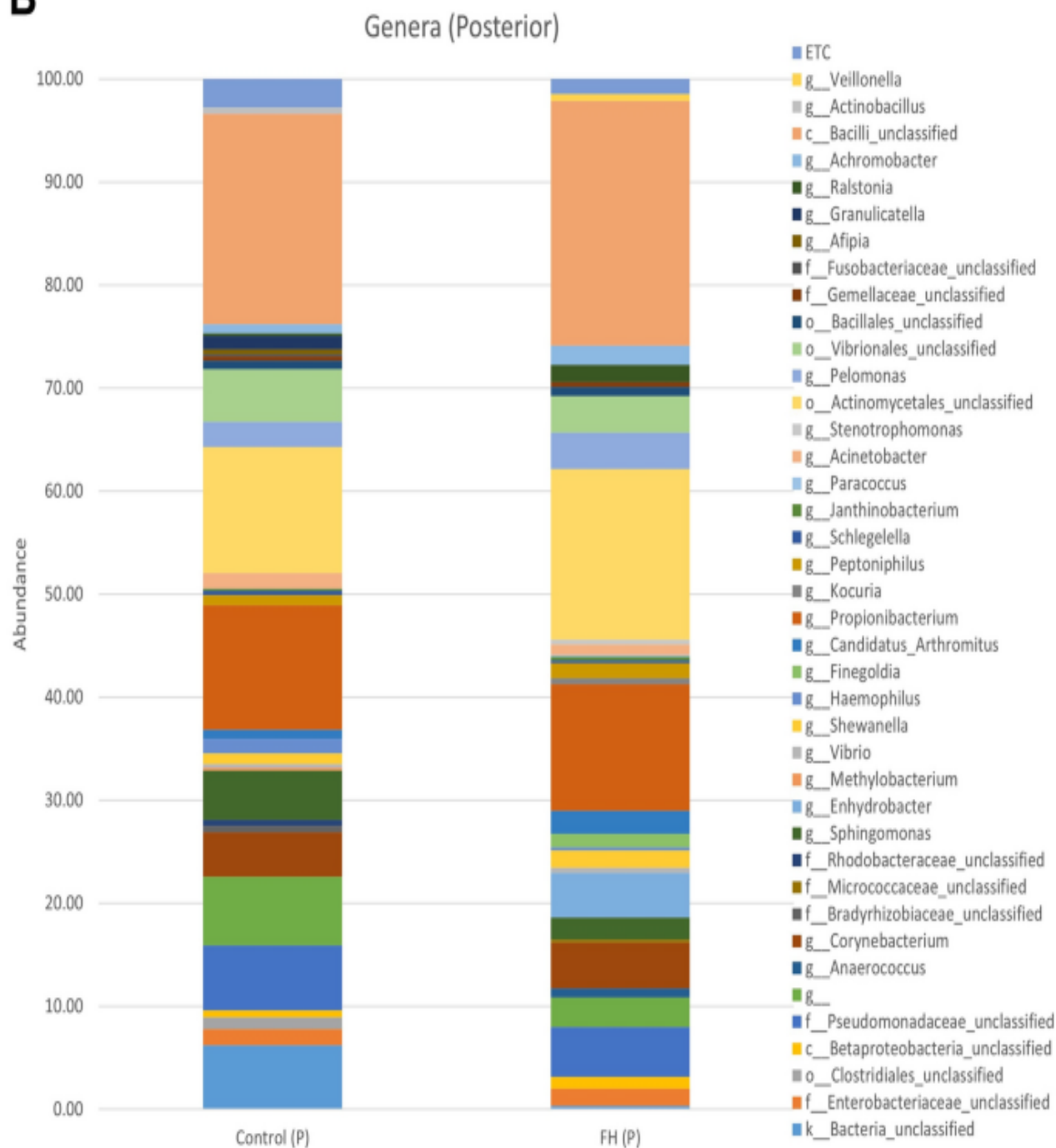
B

Figura 4. Comparación entre las comunidades microbianas a nivel de género obtenidas para cada dieta, calculadas a partir de los promedios (%) para cada grupo. El Control A y el Control P se refieren a la dieta de Control en las secciones anterior (A) y posterior (P) del intestino. FH A y FH P se refieren a la dieta suplementada con un 5% *N. gaditana* hidrolizada en las secciones anterior y posterior del intestino. ETC: sumatorio de filos cuya abundancia relativa fue < 1%.

Las puntuaciones del análisis de coordenadas principales (PCoA) se trazan en función de la abundancia relativa de los OTU pertenecientes a la microbiota intestinal de las muestras analizadas. Cada punto representa una única muestra y la distancia entre puntos representa cuán diferentes en composición son las muestras entre sí. Los puntos no mostraron separaciones claras en la composición de la comunidad microbiana entre el control y la dieta FH en ambas secciones estudiadas (Figura 5A y 5B).

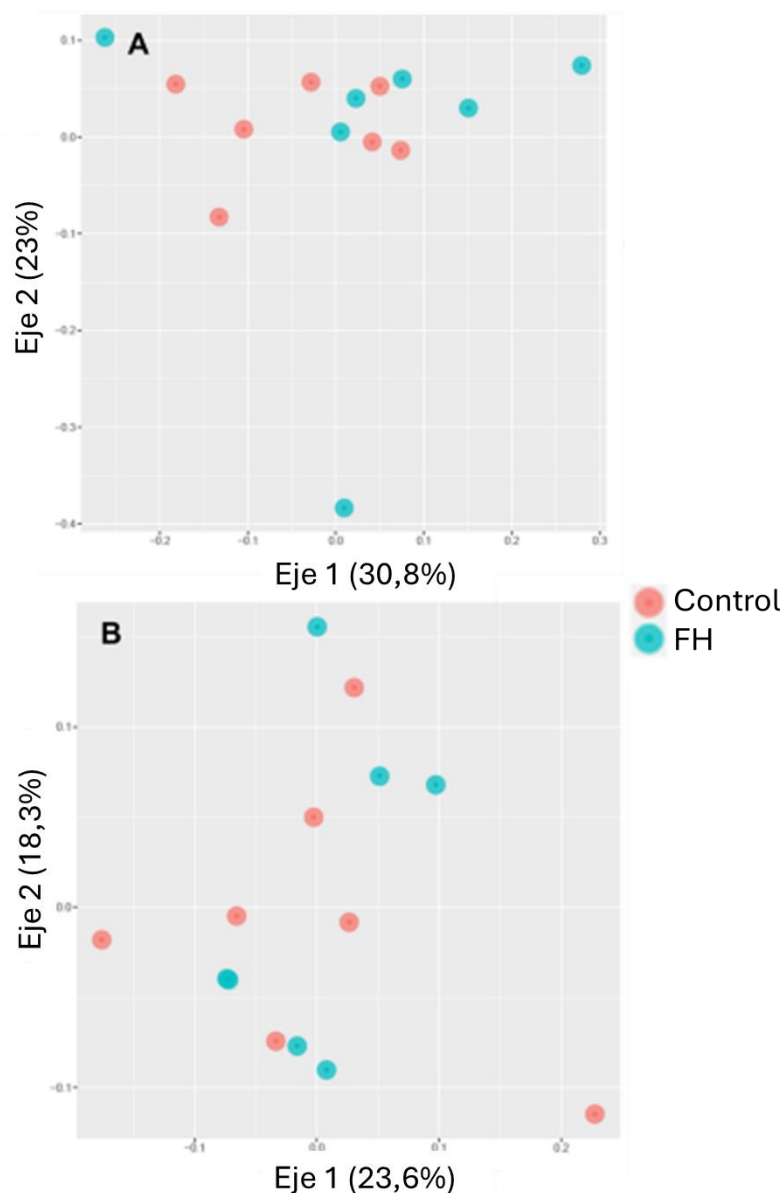


Figura 5. Análisis de coordenadas principales (PCoA) para evaluar la similitud de la microbiota intestinal de *S. aurata* a partir de la abundancia de los OTU, calculada para las sección anterior (A) y posterior (B) de cada individuo alimentado con la dieta Control o suplementada con un 5% de *N. gaditana* hidrolizada (FH).

3.3. Estudio predictivo sobre la funcionalidad de la microbiota intestinal

El estudio funcional realizado por el programa PICRUST presentó siete niveles principales (metabolismo, procesamiento de la información genética, procesamiento de la información ambiental, procesos celulares, sistemas del organismo, enfermedades humanas y desarrollo de fármacos), pero sólo tres de ellos, relacionados con las funciones intestinales, han sido estudiados de forma independiente (“metabolismo”, “procesos celulares” y “procesamiento de información ambiental”). Los resultados obtenidos muestran que estas funciones no se vieron afectadas por la dieta FH.

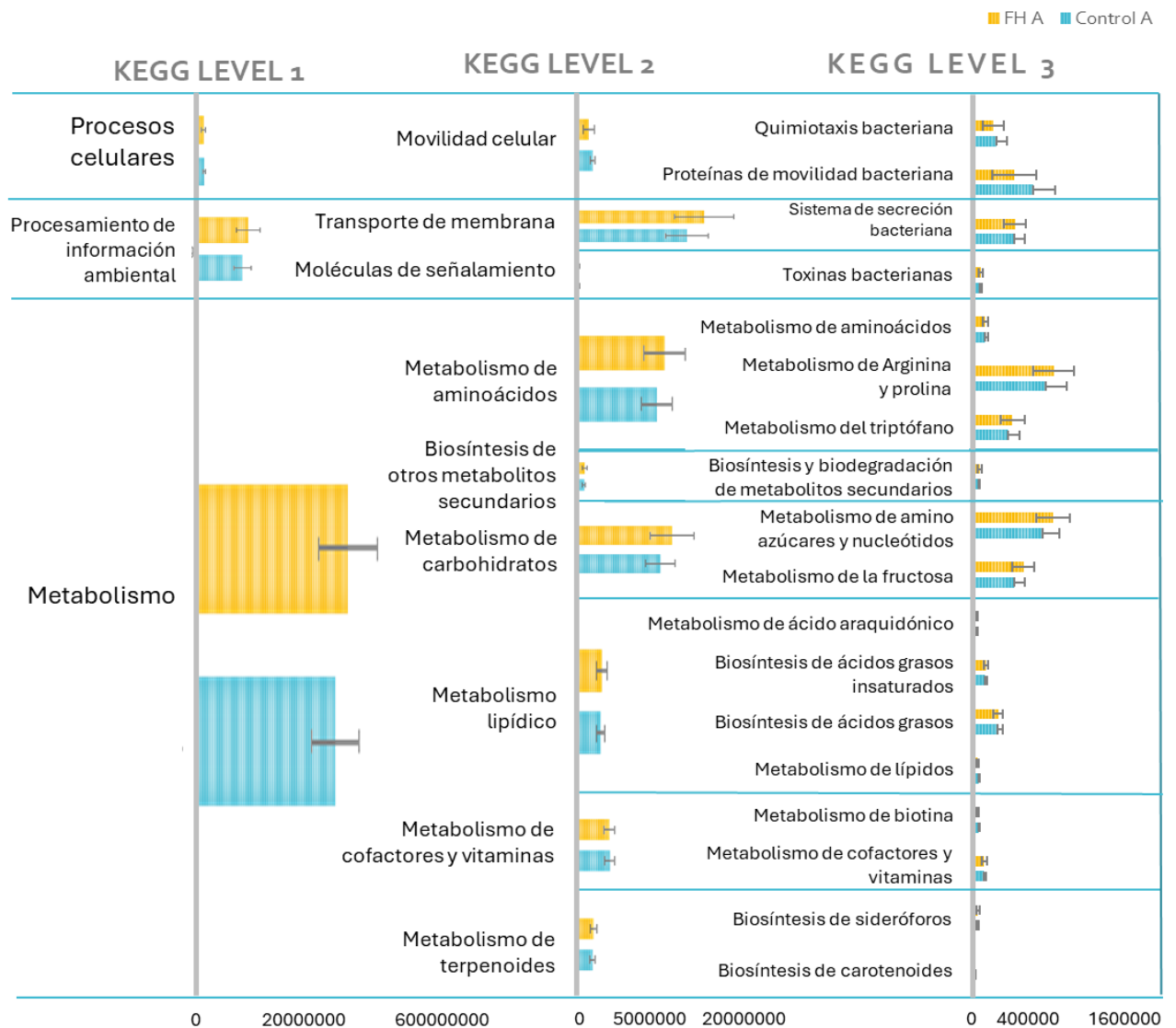
La abundancia predictiva de las categorías principales de KEGG (“metabolismo”, “procesos celulares” y “procesamiento de información ambiental”) no cambiaron entre tratamientos, aunque los procesos relacionados con el “procesamiento de información ambiental” y los “procesos celulares” aumentaron ligeramente en los tratamientos FH A (Figura 6A) y FH P (Figura 6B), pero sin ser estadísticamente significativos.

A nivel de categoría 2 en KEGG, las funciones tuvieron valores similares entre tratamientos, excepto en el “metabolismo de carbohidratos y aminoácidos” que aumentó en FH A (Figura 6A) y FH P (Figura 6B), aunque no fue significativo ($p > 0,05$). Tampoco se encontraron diferencias estadísticas entre las secciones intestinales en ninguna de las categorías estudiadas a nivel 3 en KEGG.

3.4. Expresión génica

En general, los datos del grupo FH mostraron menos dispersión en los resultados de la expresión génica que los individuos del grupo Control. Además, se observó una tendencia a la regulación negativa de los genes implicados en la permeabilidad intestinal, especialmente en la sección posterior, y en la respuesta proinflamatoria en ambas secciones del intestino ($p > 0,05$) (Figuras 7A–N). También se observó una tendencia de regulación positiva no significativa en los genes *pept1* y *muc2* relacionados con la nutrición y la protección del intestino, respectivamente, en la sección anterior en peces que recibieron la dieta FH ($p > 0,05$) (Figuras 7D y 7N). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión relativa de ninguno de los genes analizados en las muestras intestinales de peces alimentados con dietas Control o FH (Figura 7).

A



B

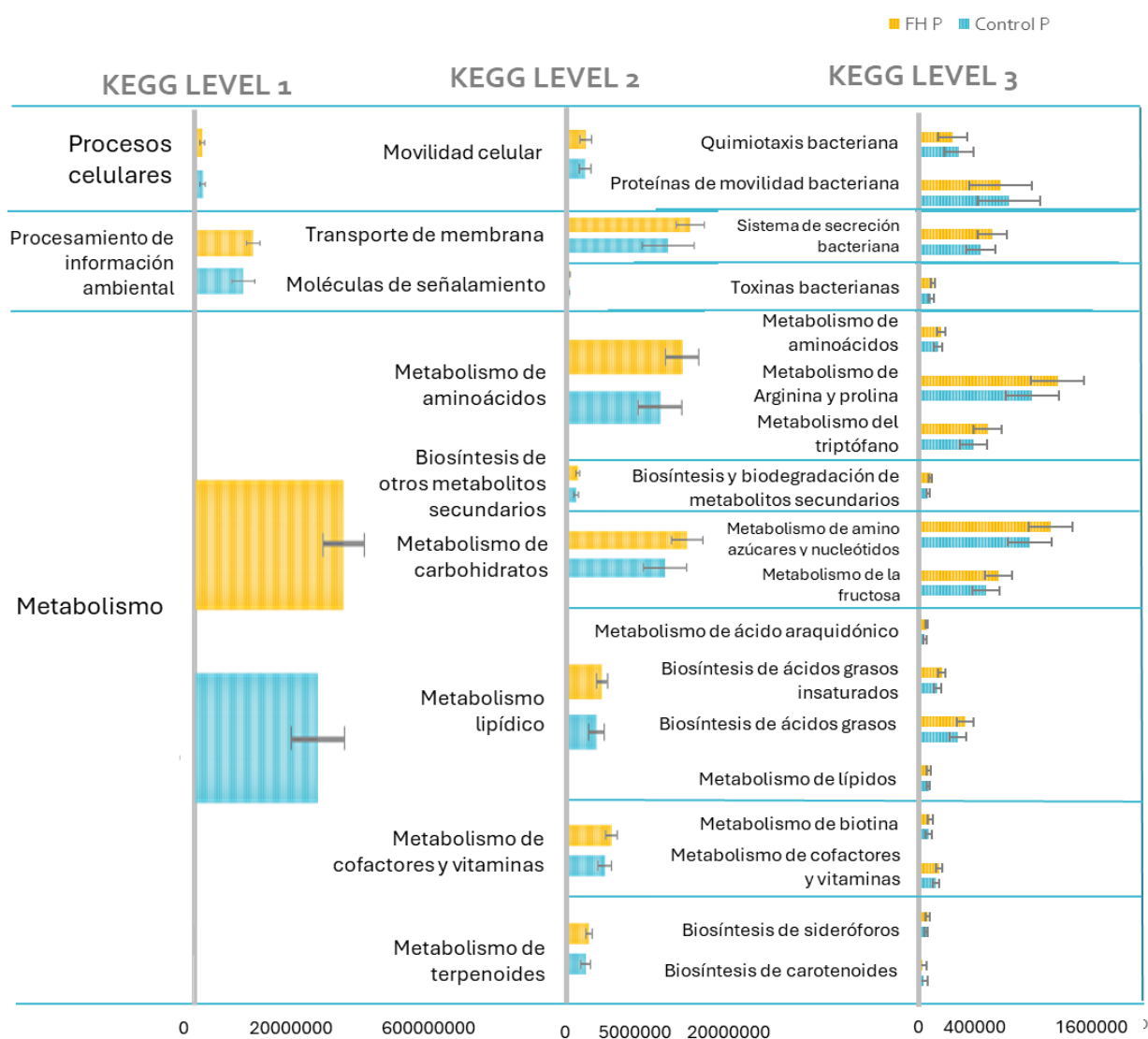
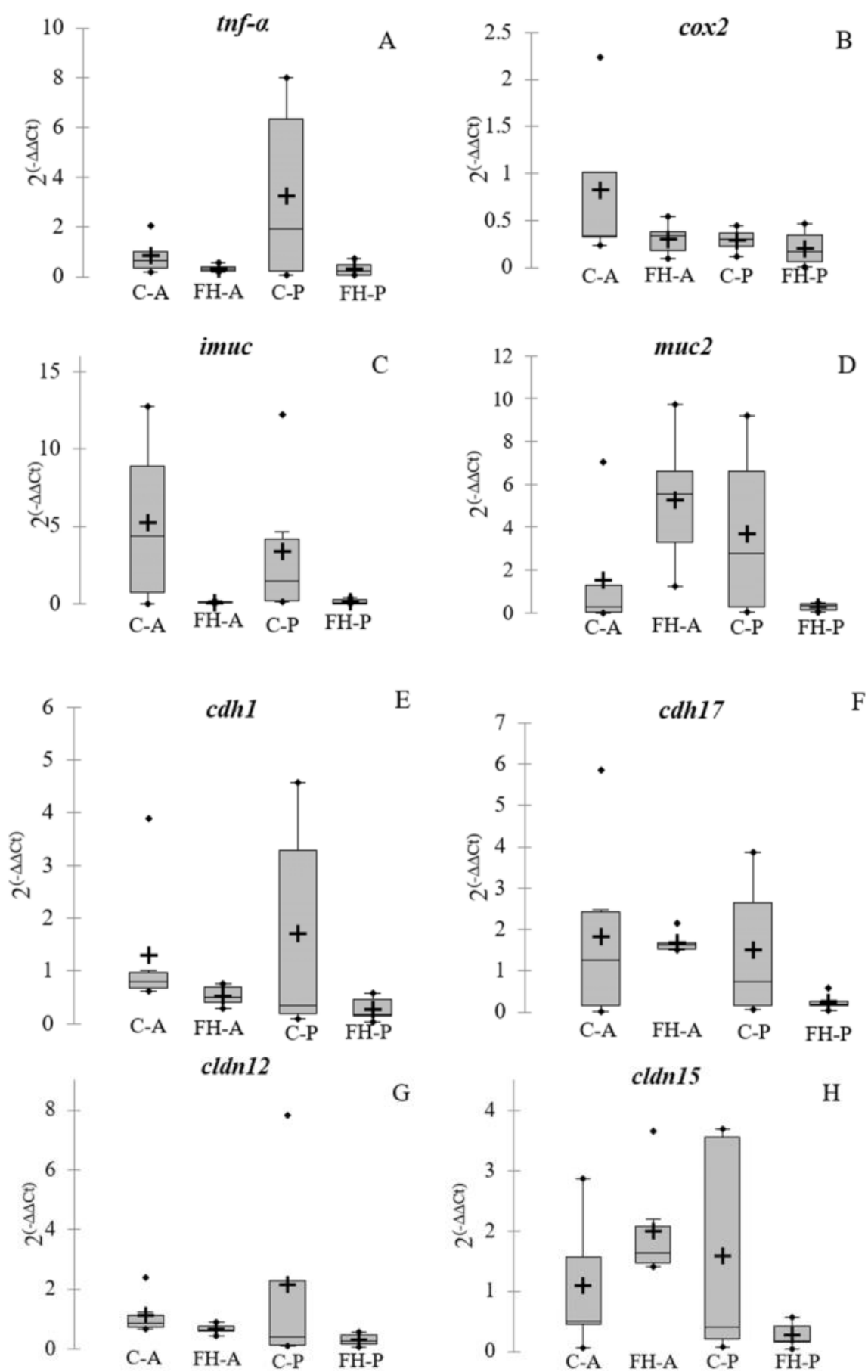


Figura 6. Funciones inferidas por PICRUSt a partir de la microbiota intestinal de *S. aurata*. Vías KEGG categorizadas a nivel 1, 2 y 3 en la sección anterior (A) y posterior (B). Las barras azules y amarillas hacen referencia a las dietas Control y FH, respectivamente.



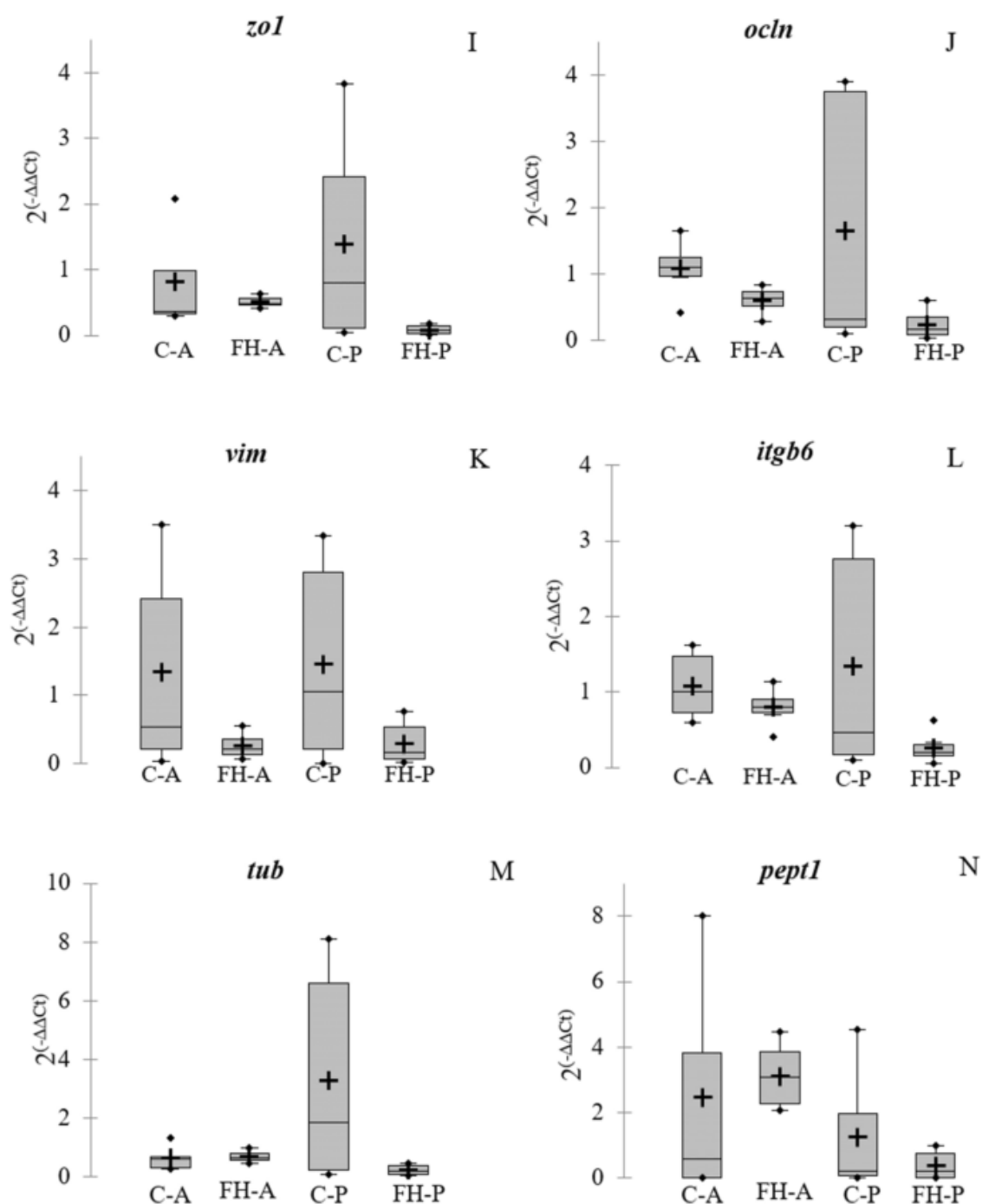


Figura 7. Representación por diagramas de caja de la expresión génica relativa en el intestino de dorada alimentada con la dieta experimental (FH) y el grupo control (C). (A) factor tumoral de necrosis α (*tnf- α*); (B) ciclooxygenasa 2 (*cox2*); (C) mucina intestinal (*imuc*); (D) mucina 2 (*muc2*); (E) cadherina 1 (*cdh1*); (F) cadherina 17 (*cdh17*); (G) claudina 12 (*cldn12*); (H) claudina 15 (*cldn15*); (I) zonula occludens 1 (*zo1*); (J) ocludina (*ocln*); (K) vimentina (*vim*); (L) integrina 6- β (*itgb6*); (M) tubulina (*tub*) y (N) transportador peptídico 1 (*pept1*). Las barras representan la expresión génica relativa (media $\pm$ error estándar) para cada grupo, en la sección anterior intestinal (A) y la sección posterior (P). Las cruces corresponden a las medias y las barras horizontales a la mediana. Los puntos por encima o por debajo de los límites superior e inferior se consideran valores atípicos. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos $p > 0,05$.

4. Discusión

El presente estudio destaca que el pez carnívoro *S. aurata* alimentado con un 5% de la microalga *N. gaditana* hidrolizada no modificó su microbiota intestinal al cabo de 12 semanas de alimentación. Esto podría resultar en un avance para la formulación de dietas piscícolas, ya que las microalgas son fuentes importantes de compuestos esenciales y nutraceuticos beneficiosos.

En este estudio se ha observado una tendencia hacia valores más homogéneos de los valores medios de la diversidad entre las secciones anterior y posterior cuando los peces son alimentados con la dieta FH. Nayak y col., (2020) mostraron que los cambios en la diversidad se deben a una adaptación de la microbiota para digerir y asimilar los nuevos ingredientes agregados, como paredes celulares, polisacáridos y lípidos, que afectan o modifican la colonización con grupos minoritarios. Evitar la pérdida de diversidad se considera un aspecto positivo que preserva la mucosa intestinal y, por tanto, protege frente a enfermedades (Nayak y col., 2020). Asimismo, hay autores que han establecido que la diversidad microbiana es considerada un biomarcador de la salud en los peces y una imagen de una buena capacidad metabólica (De Schryver y Vadstein, 2014). Piazzon y col. (2020), mantienen que *S. aurata* posee una microbiota plástica que se adapta eficazmente a los desafíos metabólicos inducidos por los cambios dietéticos y han propuesto estudios que abordan cómo estos cambios microbianos se correlacionan con la salud, el crecimiento y la resistencia a enfermedades.

Estudios previos realizados por Jorge y col. (2019) sobre el efecto de *N. gaditana* en la microbiota intestinal de dorada no han mostrado alteraciones en la morfología y función intestinal al emplear un 5% de inclusión como en el presente estudio, si bien la duración del ensayo se limitó a 1 mes y *N. gaditana* se utilizó con células enteras. Los filos detectados en este trabajo, *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*, son parte de la microbiota normal en *S. aurata* (Estruch y col., 2015; Fonseca y col., 2019; Tapia-Paniagua y col., 2020). Algunos grupos bacterianos como *Micrococcaceae* y *Ralstonia* que presentan actividad antimicrobiana y de biosíntesis de compuestos bioactivos, pueden producir metabolitos secundarios beneficiosos para el hospedador (Jami y col., 2015), y estos géneros han sido detectados en la microbiota intestinal del grupo FH. La familia *Micrococcaceae* contiene bacterias productoras de enzimas capaces de producir amilasas, celulasas, proteasas, lipasas, fitasas, tanasas, xilanasas y quitinasas (Ray y col., 2012). Estas enzimas pueden contribuir a la digestión y

asimilación de productos derivados de algas. Según Parada-Venegas y col. (2019), el filo *Actinobacteria* incluye bacterias productoras de butirato. El butirato es un ácido graso de cadena corta (AGCC) con importantes y demostrados efectos beneficiosos, también en peces como *S. aurata* (Estensoro y col., 2016). En este estudio se han detectado actinobacterias pero con una representación en todos los grupos analizados menor al 1%, incluyéndose en el grupo ETC (0,1% *Streptococcus*, o 0,6% *Actinomyces*, entre otros).

En la sección posterior, el grupo FH mostró un aumento bajo en la presencia de actinobacterias y una disminución en las cianobacterias, aunque no fue estadísticamente significativo. Las cianobacterias en general producen lipopolisacáridos que son agentes inflamatorios e irritantes gastrointestinales (Christoffersen y Kaas, 2000) y causan daño en el huésped al facilitar la colonización de otras bacterias peligrosas (Suo y col., 2017; Zanchett y Oliveira-Filho, 2013).

Clostridiaceae es una familia que estuvo presente en el grupo FH P. Esta familia está relacionada con casos de disbiosis descritos en humanos (Le Bastard y col., 2018) pero en otros animales como los cerdos, *Clostridiaceae* se ha relacionado con mejoras en la eficiencia alimenticia y el rendimiento del crecimiento, siendo también considerada beneficiosa para los peces (Piazzon y col., 2020). El grupo FH A mostró *Bacilli* y *Actinomycetales*, grupos que suelen estar presentes cuando la dieta está enriquecida en vegetales (Egerton y col., 2018).

Algunos géneros detectados en el presente estudio fueron diferentes entre zonas del intestino. En las secciones anterior y posterior se observaron OTU clasificados en el orden *Clostridiales* en Control A que no estuvieron presentes en FH A. En la sección posterior apareció *Enhydrobacter* en el tratamiento FH P. *Enhydrobacter* está presente en la microbiota intestinal de peces como *Dicentrarchus labrax* y *Salmo trutta* (Betiku y col., 2018). Se sabe que este género utiliza ciertos aminoácidos como L -arginina, L -serina y L -alanina (Staley y col., 1987), mientras que algunas especies presentan actividad celulasa (Betiku y col., 2018; Premalatha y col., 2015). Este hecho puede ser de interés ya que las celulasas hidrolizan la pared celular de *N. gaditana*, asegurando que los peces puedan absorber los compuestos intracelulares del alga, mejorando la adaptación dietética de la microbiota intestinal de *S. aurata* como se propuso antes (Piazzon y col., 2020).

Una descripción taxonómica de los grupos bacterianos presentes en la microbiota intestinal no muestra información sobre su función en el intestino (Jandhyala y col., 2015). La disponibilidad de un programa predictivo nos permite relacionar

la abundancia de los OTU obtenidos con las funciones predominantes que ocurren a nivel intestinal. En este estudio, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las vías funcionales analizadas. Las tres vías funcionales principales, “metabolismo”, “procesos celulares” y “procesamiento de información ambiental”, representaron $63,12 \pm 0,83\%$ de posibles genes funcionales del total de las muestras. Además, se analizaron los niveles 2 y 3 en KEGG, pero ninguno de ellos fue estadísticamente diferente entre los tratamientos, aunque se observó una ligera tendencia creciente de abundancia en el tratamiento FH. El resto de las funciones estuvieron representadas en la misma cantidad en ambos grupos, por lo que las células hidrolizadas no afectaron negativamente a las funciones bacterianas estudiadas de forma predictiva.

En estudios realizados con juveniles de *S. aurata* se observó que una suplementación dietética baja con hidrolizados de *Arthrospira* (2 y 4%) no tenía efectos sobre la mucosa intestinal (Galafat y col., 2020). Resultados similares encontraron Sáenz y col. (comunicación personal/resultados no publicados) en *S. aurata* utilizando ejemplares del presente estudio, reportando mediante un análisis visual de imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM), que no existían signos de daño o irritación en las microvellosidades intestinales. Nuestros resultados *in vivo* respaldan la información previa descrita, así como la obtenida *in vitro* por Vizcaíno y col., (2019), donde *N. gaditana* añadida al extracto intestinal de *S. aurata* produce una mejora en la digestión y asimilación de nutrientes.

La inclusión de un 5% de *N. gaditana* en la dieta no ha producido ninguna alteración significativa en la expresión de genes implicados en la adhesión intercelular de los enterocitos, el citoesqueleto y la adhesión a la membrana basal epidérmica (*cdh1*, *cdh17*, *cldn12*, *cldn15*, *vim*, *itgb6*, *ocln*, *tub* y *zo1*) y, por tanto, es muy probable que la integridad y permeabilidad de los peces analizados permanezcan inalteradas. Esta información se ve respaldada además por la ausencia de cambios en la expresión de marcadores comúnmente utilizados para medir los procesos proinflamatorios (*tnf- α* y *cox2*), que se han asociado con una mayor permeabilidad y alteración intestinal en varios estudios (Estruch y col., 2015; Teroza y col., 2013; Torrecillas y col., 2011, 2021). La ausencia de diferencias estadísticamente significativas en nuestro estudio también podría deberse a una alta dispersión entre individuos. Sin embargo, en el grupo FH se observó una tendencia a una regulación negativa de los genes de uniones estrechas analizados. Las dietas experimentales que han demostrado perjudicar el crecimiento de los peces se han relacionado con una reducción en la expresión de

genes implicados en el mantenimiento de las uniones estrechas en el epitelio (Estruch y col., 2015), mientras que la regulación positiva de estos genes se ha asociado con una barrera intestinal más saludable (Gisbert y col., 2017). De igual forma, la regulación positiva de genes de uniones estrechas en respuesta a diversas dietas experimentales también se ha relacionado con alteraciones nutricionales, osmorreguladoras y fisiológicas, lo que no es deseable para dorada (Cerezuela y col., 2013; Estensoro y col., 2016). Por lo tanto, son necesarios más análisis de genes relacionados con el sistema inmunitario, así como estudios histológicos, para confirmar el estado real de la integridad y permeabilidad intestinal.

El transportador peptídico 1 (PepT1) es un transportador de nutrientes de baja afinidad y alta capacidad que media la absorción de dipéptidos y tripéptidos de la dieta, esenciales para que los peces mantengan su desarrollo, crecimiento y metabolismo (Wang y col., 2017). En nuestro estudio no se observó diferencia estadísticamente significativa en la expresión del gen *pept1* entre los grupos analizados. Sin embargo, tanto el grupo Control, como FH mostraron niveles de expresión más altos de *pept1* en la sección anterior del intestino en comparación con la sección posterior. Además, se observó una tendencia a la regulación positiva de *pept1* en el grupo FH en comparación con el grupo Control, en la sección anterior del intestino. Una mayor expresión de *pept1* en la sección anterior es consistente con estudios que indican que el intestino proximal es el área de mayor expresión de esta proteína en los peces, específicamente en las células epiteliales de absorción a lo largo de los pliegues mucosos (Ostaszewska y col., 2010; Teroiva y col., 2013). La tendencia que indica una ligera regulación positiva de *pept1* en el grupo FH puede sugerir una mejor absorción de nutrientes. En los vertebrados superiores, se encontró un mayor aumento de peso y una mayor expresión de *pept1* en el intestino en respuesta a una dieta con proteína de soja de alta calidad (Gilbert y col., 2008). Teroiva y col., (2013) encontró que una dieta que contenía un 15% de proteínas vegetales (concretamente un concentrado de proteína de guisante verde) inducía niveles significativamente más bajos de transcripción de *pept1* y se asociaba con un menor crecimiento en la dorada. La dorada alimentada con una dieta estricta de proteínas vegetales también mostró niveles más bajos de expresión de *pept1*, lo cual se ha relacionado con una menor digestibilidad y menor transporte de péptidos pequeños (Estruch y col., 2018). Tomando la expresión del gen *pept1* como marcador de la calidad proteica de la dieta y la eficiencia de absorción, nuestros resultados sugieren que la sustitución del 5% de *N. gaditana*

en la dieta probablemente no esté afectando a la ingesta de nutrientes en la dorada. También es cierto que la alta dispersión entre individuos puede estar afectando a la significación de los resultados y, por tanto, ocultando posibles efectos beneficiosos.

En este estudio, la inclusión de *N. gaditana* no afectó los genes relacionados con las mucinas (*muc2* e *imuc*) entre los grupos Control y FH. Las mucinas contribuyen a la protección del epitelio intestinal frente a una amplia variedad de daños (Pérez-Sánchez y col., 2013). El aumento de la producción de mucina intestinal se ha relacionado con una reducción de la translocación bacteriana en peces alimentados con una dieta que contiene oligosacáridos derivados de levadura (Torrecillas y col., 2011).

En resumen, la inclusión en la dieta comercial de un 5% de microalga *N. gaditana* sometida a hidrólisis enzimática no altera la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal, ni la expresión de genes de integridad y permeabilidad en el intestino del pez carnívoro *S. aurata*.

Referencias

- Alarcón, F. J., Moyano, F. J., & Díaz, M. (1999). Effect of inhibitors present in protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). *Aquatic Living Resources*, 12(4), 233–238. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(00\)86633-4](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(00)86633-4)
- Almendinger, M., Saalfrank, F., Rohn, S., Kurth, E., Springer, M., & Pleissner, D. (2021). Characterization of selected microalgae and cyanobacteria as sources of compounds with antioxidant capacity. *Algal Research*, 53, 102168. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102168>
- Amenyogbe, E., Chen, G., Wang, Z., Huang, J. S., Huang, B., & Li, H. (2020). The exploitation of probiotics, prebiotics and synbiotics in aquaculture: present study, limitations and future directions : a review. *Aquaculture International*, 28(3), 1017–1041. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00509-0>
- Ayala, M. D., Galián, C., Fernández, V., Chaves-Pozo, E., de la Serrana, D. G., Sáez, M. I., Díaz, A. G., Alarcón, F. J., Martínez, T. F., & Arizcun, M. (2020a). Influence of low dietary inclusion of the microalga *Nannochloropsis gaditana* (Lubián 1982) on performance, fish morphology, and muscle growth in juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Animals*, 10(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ani10122270>
- Bae, J., Hamidoghli, A., Won, S., Choi, W., Lim, S.-G., Kim, K.-W., Lee, B.-J., Hur, S.-W., & Bai, S. C. (2020). Evaluation of seven different functional feed additives in a low fish meal diet for olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 525, 735333. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735333>
- Beltrán, J. M. G., Espinosa, C., Guardiola, F. A., & Esteban, M. Á. (2018). In vitro effects of *Origanum vulgare* leaf extracts on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes, cytotoxic, bactericidal and antioxidant activities. *Fish and Shellfish Immunology*, 79, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.005>
- Betiku, O. C., Yeoman, C. J., Gaylord, T. G., Americus, B., Olivo, S., Duff, G. C., & Sealey, W. M. (2018). Water system is a controlling variable modulating bacterial diversity of gastrointestinal tract and performance in rainbow trout. *PLoS ONE*, 13(4), 195967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195967>
- Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S., Vonshak, A., & Cohen, Z. (2002). Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry*, 60(5), 497–503. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00100-0](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00100-0)
- Bulfon, C., Volpatti, D., & Galeotti, M. (2015). Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquaculture Research*, 46(3), 513–551. <https://doi.org/10.1111/are.12238>
- Camacho-Rodríguez, J., González-Céspedes, A. M., Cerón-García, M. C., Fernández-Sevilla, J. M., Acien-Fernández, F. G., & Molina-Grima, E. (2014). A quantitative study of eicosapentaenoic acid (EPA) production by *Nannochloropsis gaditana* for aquaculture as a function of dilution rate, temperature and average irradiance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(6), 2429–2440. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5413-9>
- Cerezuela, R., Meseguer, J., & Esteban, M. Á. (2013). Effects of dietary inulin, *Bacillus subtilis* and microalgae on intestinal gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 34(3), 843–848. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.12.026>
- Chakraborty, S. B., Horn, P., & Hancz, C. (2014). Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. *Reviews in Aquaculture*, 6(1), 1–19. <https://doi.org/10.1111/raq.12021>

- Chi, C., Giri, S. S., Jun, J. W., Kim, H. J., Yun, S., Kim, S. G., & Park, S. C. (2016). Immunomodulatory effects of a bioactive compound isolated from *dryopteris crassirhizoma* on the grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Journal of Immunology Research*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/3068913>
- Christoffersen, K., & Kaas, H. (2000). Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring, and management. In *Limnology and Oceanography*, 45 (5). E & FN Spon. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.5.1212>
- De Schryver, P., & Vadstein, O. (2014). Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. *The ISME Journal*, 8(12), 2360–2368. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.84>
- Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I. L., Agellon, L. B., & Xia, J. (2017). MicrobiomeAnalyst: A web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W180–W188. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx295>
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The gut microbiota of marine fish. In *Frontiers in Microbiology* 9 (MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>
- Elumalai, P., Kurian, A., Lakshmi, S., Faggio, C., Esteban, M. A., & Ringø, E. (2020). Herbal Immunomodulators in Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 1–25. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1779651>
- Estensoro, I., Ballester-Lozano, G., Benedito-Palos, L., Grammes, F., Martos-Sitcha, J. A., Mydland, L.-T., Caldach-Giner, J. A., Fuentes, J., Karalazos, V., Ortiz, Á., Øverland, M., Sitjà-Bobadilla, A., & Pérez-Sánchez, J. (2016). Dietary butyrate helps to restore the intestinal status of a marine teleost (*Sparus aurata*) fed extreme diets low in fish meal and fish oil. *PLOS ONE*, 11(11), e0166564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166564>
- Estruch, G., Collado, M. C., Peñaranda, D. S., Tomás Vidal, A., Jover Cerdá, M., Pérez Martínez, G., Martínez-Llorens, S., & Moreau, C. S. (2015). Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on the gastrointestinal microbiota determined by pyrosequencing the 16S rRNA gene. *PLoS ONE*, 10(8), 136389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136389>
- Estruch, G., Collado, M. C., Monge-Ortiz, R., Tomás-Vidal, A., Jover-Cerdá, M., Peñaranda, D. S., Pérez Martínez, G., & Martínez-Llorens, S. (2018). Long-term feeding with high plant protein based diets in gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) leads to changes in the inflammatory and immune related gene expression at intestinal level. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 302. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1626-6>
- Fonseca, F., Cerqueira, R., & Fuentes, J. (2019). Impact of ocean acidification on the intestinal microbiota of the marine sea bream (*Sparus aurata* L.). *Frontiers in Physiology*, 10, 1446. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01446>
- Gaber, M. M. (2006). The effects of plant-protein-based diets supplemented with *Yucca* on growth, digestibility, and chemical composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) fingerlings. *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(1), 74–81. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2006.00008.x>
- Galafat, A., Vizcaíno, A. J., Sáez, M. I., Martínez, T. F., Jérez-Cepa, I., Mancera, J. M., & Alarcón, F. J. (2020). Evaluation of *Arthrospira* sp. enzyme hydrolysate as dietary additive in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Journal of Applied Phycology*, 32(5), 3089–3100. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02141-0>

- Gilbert, E. R., Li, H., Emmerson, D. A., Webb, K. E., & Wong, E. A. (2008). Dietary protein quality and feed restriction influence abundance of nutrient transporter mRNA in the small intestine of broiler chicks. *Journal of Nutrition*, 138(2), 262–271. <https://doi.org/10.1093/jn/138.2.262>
- Gisbert, E., Andree, K. B., Quintela, J. C., Caldach-Giner, J. A., Ipharraguerre, I. R., & Pérez-Sánchez, J. (2017). Olive oil bioactive compounds increase body weight, and improve gut health and integrity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *British Journal of Nutrition*, 117(3), 351–363. <https://doi.org/10.1017/S0007114517000228>
- Herrero, M., Mendiola, J. A., Plaza, M., & Ibañez, E. (2012). Screening for bioactive compounds from algae. *Advanced Biofuels and Bioproducts*, 9781461433, 833–872. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3348-4_35
- Hoseinifar, S. H., Yousefi, S., Capillo, G., Paknejad, H., Khalili, M., Tabarraei, A., Van Doan, H., Spanò, N., & Faggio, C. (2018). Mucosal immune parameters, immune and antioxidant defence related genes expression and growth performance of zebrafish (*Danio rerio*) fed on *Gracilaria gracilis* powder. *Fish and Shellfish Immunology*, 83, 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.046>
- Jami, M., Ghanbari, M., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2015). Phylogenetic diversity and biological activity of culturable *Actinobacteria* isolated from freshwater fish gut microbiota. *Microbiological Research*, 175, 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.01.009>
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), 8787–8803. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
- Jorge, S. S., Enes, P., Serra, C. R., Castro, C., Iglesias, P., Oliva Teles, A., & Couto, A. (2019). Short-term supplementation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) diets with *Nannochloropsis gaditana* modulates intestinal microbiota without affecting intestinal morphology and function. *Aquaculture Nutrition*, 25(6), 1388–1398. <https://doi.org/10.1111/anu.12959>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kortner, T. M., Valen, E. C., Kortner, H., Marjara, I. S., Krogdahl, shild, & Bakke, A. M. (2011). Candidate reference genes for quantitative real-time PCR (qPCR) assays during development of a diet-related enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and the potential pitfalls of uncritical use of normalization software tools. *Aquaculture*, 318(3–4), 355–363. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.038>
- Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepile, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., Beiko, R. G., & Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31(9), 814–821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>
- Le Bastard, Q., Al-Ghalith, G. A., Grégoire, M., Chapelet, G., Javaudin, F., Dailly, E., Batard, E., Knights, D., & Montassier, E. (2018). Systematic review: human gut dysbiosis induced by non-antibiotic prescription medications. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 47(3), 332–345. <https://doi.org/10.1111/apt.14451>
- Lee, A. K., Lewis, D. M., & Ashman, P. J. (2012). Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass and Bioenergy*, 46, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.034>

- Li, J., Han, D., Wang, D., Ning, K., Jia, J., Wei, L., Jing, X., Huang, S., Chen, J., Li, Y., Hu, Q., & Xu, J. (2014). Choreography of transcriptomes and lipidomes of *Nannochloropsis* reveals the mechanisms of oil synthesis in microalgae. *Plant Cell*, 26(4), 1645–1665. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.121418>
- Li, Q., Zhou, Z., Zhang, D., Wang, Z., & Cong, W. (2020). Lipid extraction from *Nannochloropsis oceanica* biomass after extrusion pretreatment with twin-screw extruder: optimization of processing parameters and comparison of lipid quality. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(4), 655–662. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02263-x>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lubián, L. M., Montero, O., Moreno-Garrido, I., Huertas, I. E., Sobrino, C., González-Del Valle, M., & Parés, G. (2000). *Nannochloropsis* (*Eustigmatophyceae*) as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology*, 12(3–5), 249–255. <https://doi.org/10.1023/a:1008170915932>
- Mahdy, A., Mendez, L., Blanco, S., Ballesteros, M., & González-Fernández, C. (2014). Protease cell wall degradation of *Chlorella vulgaris*: Effect on methane production. *Bioresource Technology*, 171, 421–427. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.091>
- Martínez, G., Shaw, E. M., Carrillo, M., & Zanuy, S. (1998). Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *BioTechniques*, 24(2), 238–239. <https://doi.org/10.2144/98242bm14>
- Matos, Â. P., Teixeira, M. S., Corrêa, F. M. P. S., Machado, M. M., Werner, R. I. S., Aguiar, A. C., Cubas, A. L. V., Sant'Anna, E. S., & Moecke, E. H. S. (2019). Disruption of *Nannochloropsis gaditana* (*Eustigmatophyceae*) rigid cell wall by non-thermal plasma prior to lipid extraction and its effect on fatty acid composition. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 36(4), 1419–1428. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190364s20190097>
- Mendes-Pinto, M. M., Raposo, M. F. J., Bowen, J., Young, A. J., & Morais, R. (2001). Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: Effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *Journal of Applied Phycology*, 13(1), 19–24. <https://doi.org/10.1023/A:1008183429747>
- Michalak, I., & Chojnacka, K. (2015). Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Sciences*, 15(2), 160–176. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400191>
- Millao, S., & Uquiche, E. (2016). Antioxidant activity of supercritical extracts from *Nannochloropsis gaditana*: Correlation with its content of carotenoids and tocopherols. *The Journal of Supercritical Fluids*, 111, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.02.002>
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993>
- Nayak, S., Ashhab, A. Al, Zilberg, D., & Khozin-goldberg, I. (2020). Dietary supplementation with omega-6 LC-PUFA- rich microalgae regulates mucosal immune response and promotes microbial diversity in the zebrafish gut. *Biology*, 9(6), 1–21. <https://doi.org/10.3390/biology9060119>

- Ostaszewska, T., Dabrowski, K., Kamaszewski, M., Grochowski, P., Verri, T., Rzepkowska, M., & Wolnicki, J. (2010). The effect of plant protein-based diet supplemented with dipeptide or free amino acids on digestive tract morphology and PepT1 and PepT2 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 157(2), 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.06.162>
- Parada Venegas, D., De la Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H. J. M., Faber, K. N., & Hermoso, M. A. (2019). Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), 424615. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>
- Pedrós-Alió, C. (2006). Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology*, 14(6), 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.04.007>
- Pérez-Sánchez, J., Benedito-Palos, L., Estensoro, I., Petropoulos, Y., Caldach-Giner, J. A., Browdy, C. L., & Sitjà-Bobadilla, A. (2015). Effects of dietary NEXT ENHANCE®150 on growth performance and expression of immune and intestinal integrity related genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 44(1), 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.039>
- Pérez-Sánchez, J., Estensoro, I., Redondo, M. J., Caldach-Giner, J. A., Kaushik, S., & Sitjà-Bobadilla, A. (2013). Mucins as diagnostic and prognostic biomarkers in a fish-parasite Model: transcriptional and functional analysis. *PLoS ONE*, 8(6), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065457>
- Piazzon, M. C., Naya-Català, F., Perera, E., Palenzuela, O., Sitjà-Bobadilla, A., & Pérez-Sánchez, J. (2020). Genetic selection for growth drives differences in intestinal microbiota composition and parasite disease resistance in gilthead sea bream. *Microbiome*, 8(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00922-w>
- Premalatha, N., Gopal, N. O., Jose, P. A., Anandham, R., & Kwon, S. W. (2015). Optimization of cellulase production by *Enhydrobacter* sp. ACCA2 and its application in biomass saccharification. *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01046>
- Ray, A. K., Ghosh, K., & Ringø, E. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*, 18(5), 465–492. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x>
- Ryckebosch, E., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Goiris, K., Muylaert, K., & Foubert, I. (2014). Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. *Food Chemistry*, 160, 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.087>
- Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2019). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(4), 709–722. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>
- Silveira Júnior, A. M., Faustino, S. M. M., & Cunha, A. C. (2019). Bioprospection of biocompounds and dietary supplements of microalgae with immunostimulating activity: a comprehensive review. *PeerJ*, 7(10), e7685. <https://doi.org/10.7717/peerj.7685>
- Staley, J. T., Irgens, R. L., & Brenner, D. J. (1987). *Enhydrobacter aerosaccus* gen. nov., sp. nov., a Gas-vacuolated, facultatively anaerobic, heterotrophic rod. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(3), 289–291. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-3-289>

- Sundh, H., & Sundell, K. S. (2015). Environmental impacts on fish mucosa. *Mucosal Health in Aquaculture*, 171–197. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00007-8>
- Suo, Y., Li, E., Li, T., Jia, Y., Qin, J. G., Gu, Z., & Chen, L. (2017). Response of gut health and microbiota to sulfide exposure in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 63, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.02.008>
- Tapia-Paniagua, S. T., Vidal, S., Lobo, C., García de la Banda, I., Esteban, M. A., Balebona, M. C., & Moriñigo, M. A. (2015). Dietary administration of the probiotic SpPdp11: Effects on the intestinal microbiota and immune-related gene expression of farmed *Solea senegalensis* treated with oxytetracycline. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(2), 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.07.007>
- Tapia-Paniagua, S. T., Vidal, S., Lobo, C., Prieto-Álamo, M. J., Jurado, J., Cordero, H., Cerezuela, R., García de la Banda, I., Esteban, M. A., Balebona, M. C., & Moriñigo, M. A. (2014). The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease. *Fish and Shellfish Immunology*, 41(2), 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.019>
- Tapia-Paniagua, Silvana T., Balebona, M. del C., Firmino, J. P., Rodríguez, C., Polo, J., Moriñigo, M. A., & Gisbert, E. (2020). The effect of spray-dried porcine plasma on gilthead seabream (*Sparus aurata*) intestinal microbiota. *Aquaculture Nutrition*, 26(3), 801–811. <https://doi.org/10.1111/anu.13039>
- Tapia-Paniagua, Silvana Teresa, Chabrillón, M., Díaz-Rosales, P., de la Banda, I. G., Lobo, C., Balebona, M. C., & Moriñigo, M. A. (2010). Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbial Ecology*, 60(2), 310–319. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9680-z>
- Terova, G., Robaina, L., Izquierdo, M., Cattaneo, A. G., Molinari, S., Bernardini, G., & Saroglia, M. (2013). PepT1 mRNA expression levels in sea bream (*Sparus aurata*) fed different plant protein sources. *SpringerPlus*, 2(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-17>
- Thilsted, S. H., Thorne-Lyman, A., Webb, P., Bogard, J. R., Subasinghe, R., Phillips, M. J., & Allison, E. H. (2016). Sustaining healthy diets: The role of capture fisheries and aquaculture for improving nutrition in the post-2015 era. *Food Policy*, 61, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2016.02.005>
- Torrecillas, S., Makol, A., Benítez-Santana, T., Caballero, M. J., Montero, D., Sweetman, J., & Izquierdo, M. (2011). Reduced gut bacterial translocation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Fish and Shellfish Immunology*, 30(2), 674–681. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.12.020>
- Torrecillas, S., Terova, G., Makol, A., Serradell, A., Valdenegro-Vega, V., Izquierdo, M., Acosta, F., & Montero, D. (2021). Dietary phytogenics and galactomannan oligosaccharides in low fish meal and fish oil-based diets for european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: Effects on gill structure and health and implications on oxidative stress status. *Frontiers in Immunology*, 12, 222063. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.663106>
- Vizcaíno, A. J., Sáez, M. I., Martínez, T. F., Ación, F. G., & Alarcón, F. J. (2018). Differential hydrolysis of proteins of four microalgae by the digestive enzymes of gilthead sea bream and Senegalese sole. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.018>
- Vizcaíno, A. J., Sáez, M. I., Martínez, T. F., Ación, F. G., & Alarcón, F. J. (2019). Differential hydrolysis of proteins of four microalgae by the digestive enzymes of gilthead sea bream and Senegalese sole. *Algal Research*, 37, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.018>

- Wang, J., Yan, X., Lu, R., Meng, X., & Nie, G. (2017). Peptide transporter 1 (PepT1) in fish: A review. *Aquaculture and Fisheries*, 2(5), 193–206. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2017.06.007>
- Won, S., Moniruzzaman, M., Lee, S., Hong, J., Park, J. K., Kim, S., & Bai, S. C. (2017). Evaluation of dietary natural mineral materials as an antibiotic replacer on growth performance, non-specific immune responses and disease resistance in Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Research*, 48(9), 4735–4747. <https://doi.org/10.1111/are.13295>
- Xu, S., Zhang, L., Wu, Q., Liu, X., Wang, S., You, C., & Li, Y. (2011). Evaluation of dried seaweed *Gracilaria lemaneiformis* as an ingredient in diets for teleost fish *Siganus canaliculatus*. *Aquaculture International*, 19(5), 1007–1018. <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9418-z>
- Xuan, X., Wen, X., Li, S., Zhu, D., & Li, Y. (2013). Potential use of macro-algae *Gracilaria lemaneiformis* in diets for the black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*, juvenile. *Aquaculture*, 412–413, 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.07.022>
- Yap, B. H. J., Dumsday, G. J., Scales, P. J., & Martin, G. J. O. (2015). Energy evaluation of algal cell disruption by high pressure homogenisation. *Bioresource Technology*, 184, 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.049>
- Younis, E. S. M., Al-Quffail, A. S., Al-Asgah, N. A., Abdel-Warith, A. W. A., & Al-Hafedh, Y. S. (2018). Effect of dietary fish meal replacement by red algae, *Gracilaria arcuata*, on growth performance and body composition of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.06.012>
- Zanchett, G., & Oliveira-Filho, E. C. (2013). *Cyanobacteria* and cyanotoxins: From impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. *Toxins*, 5(10), 1896–1917. <https://doi.org/10.3390/toxins5101896>
- Zhang, J. X., Guo, L. Y., Feng, L., Jiang, W. D., Kuang, S. Y., Liu, Y., Hu, K., Jiang, J., Li, S. H., Tang, L., & Zhou, X. Q. (2013). Soybean β -Conglycinin induces inflammation and oxidation and causes dysfunction of intestinal digestion and absorption in fish. *PLoS ONE*, 8(3), 58115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058115>

Material Suplementario

Tabla Suplementaria 1. Listado de los genes estudiados en este trabajo para el intestino de *S. aurata*

Genes	Código	Referencia
Genes de Referencia		
Factor de elongación 1 α	<i>ef1α</i>	(Kortner y col., 2011)
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa ribosómica	<i>gadh</i>	(Kortner y col., 2011)
Permeabilidad e integridad		
Caderina 1	<i>cdh1</i>	(Pérez-Sánchez y col., 2015)
Caderina 17	<i>cdh17</i>	(Pérez-Sánchez y col., 2015)
Claudina 12	<i>cldn12</i>	(Pérez-Sánchez y col., 2015)
Claudina 15	<i>cldn15</i>	(Pérez-Sánchez y col., 2015)
Vimentina	<i>vim</i>	(Pérez-Sánchez y col., 2015)
Integrina 6- β	<i>itgb6</i>	(Pérez-Sánchez y col., 2015)
Ocludina	<i>ocln</i>	(Pérez-Sánchez y col., 2015)
Tubulina	<i>tub</i>	(Cerezuela y col., 2013)
Zonula occludens 1	<i>zo1</i>	(Cerezuela y col., 2013)
Pro-inflamatorios and mucinas		
Factor de necrosis tumoral α	<i>tnf-α</i>	(Estruch y col., 2018)
Ciclooxigenasa 2	<i>cox2</i>	(Estruch y col., 2018)
Mucina intestinal	<i>imuc</i>	(Estruch y col., 2018)
Mucina 2	<i>muc2</i>	(Estruch y col., 2018)
Absorción de nutrientes		
Transportador de peptidos 1	<i>pept1</i>	(Estruch y col., 2018)

Tabla Suplementaria 2. Los valores de abundancia relativa de las familias y géneros en cada sección intestinal y pez analizado.

Debido a la magnitud de la tabla, puede ser descargado en:

<https://www.nature.comet/articles/s41598-021-98087-5#additional-information>



Capítulo 2





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Análisis de las interacciones de las comunidades microbianas presentes en la piel y las branquias de *Sparus aurata* tras la alimentación de una dieta suplementada con *Nannochloropsis* sp. y *Arthrospira* sp.

Resumen

La inclusión de microorganismos fotosintéticos en dietas funcionales para peces tiene un profundo impacto en el bienestar, el metabolismo y la fisiología del organismo. Las comunidades microbianas asociadas a los peces están directamente influenciadas por la dieta del hospedador, y es necesario comprender mejor el impacto sobre la microbiota de las mucosas. Este estudio tenía como objetivo analizar la microbiota asociada a la piel y las branquias de *Sparus aurata* alimentado con una dieta que contenía un 10% de *Nannochloropsis* sp. y *Arthrospira* sp. Se emplearon las regiones variables V3-V4 de ADNr 16S para determinar la composición de las comunidades microbianas. El estudio empleó herramientas bioinformáticas para explorar la composición taxonómica y las interacciones de la microbiota, destacando la integración del análisis taxonómico y las redes de coocurrencia para comprender la dinámica de la comunidad microbiana y el impacto de las dietas funcionales.

Los resultados indicaron cambios sutiles en la composición de la microbiota de la piel y las branquias. Sin embargo, se observaron diferencias notables en las redes de interacción bacteriana. Las redes de la piel y las branquias mostraban patrones generales distintos, influidos por sus respectivos entornos y funciones. La red branquial mostraba una estructura altamente conectada y redundante, lo que aumentaba su resistencia a perturbaciones ambientales, mientras que la red cutánea mostraba una estructura más fragmentada, que sugería una vulnerabilidad potencialmente mayor a las perturbaciones. Se identificaron taxones clave, como *Acinetobacter* y *Polaribacter*, fundamentales para mantener la estabilidad de estos ecosistemas microbianos. *Polaribacter* podría demostrar una protección potencial contra los patógenos a través de interacciones negativas. Estas observaciones subrayan la importancia de entender la composición y las

interacciones dentro de los grupos bacterianos para comprender la dinámica de las comunidades microbianas.

1. Introducción

Las dietas han sido durante mucho tiempo un punto central para los investigadores debido a su impacto significativo en el bienestar general del organismo (Santesso y col., 2012; Gibney y Forde, 2022). El papel que los nutrientes y moléculas tienen en la síntesis de la estructura celular y la producción de energía ha sido bien establecido (Althoff y col., 2022). Los esfuerzos de investigación también se han dedicado a estudiar cómo ciertos componentes no deseados en las dietas pueden afectar al metabolismo y la fisiología de los organismos (Requena y col., 2018), siendo un componente esencial para su estudio, la microbiota.

El término microbiota, hace referencia a las complejas y diversas comunidades microbianas presentes en una ubicación específica (Berg y col., 2020). Estas células vivas realizan funciones vitales y adquieren los nutrientes necesarios para su supervivencia de diversas fuentes según su ubicación, siendo la dieta del hospedador un factor que influye directamente en la microbiota intestinal (Leeming y col., 2019.; Singh y col., 2017). Esta microbiota utiliza componentes dietéticos y genera numerosas moléculas que pueden atravesar el intestino y alcanzar ubicaciones distantes de este (den Besten y col., 2013). El efecto de la dieta en la microbiota intestinal ha sido ampliamente estudiado (Clemente y col., 2012), siendo actualmente un campo de interés de los investigadores el impacto de la dieta en otros tejidos y órganos como el hígado, los riñones, el bazo, el cerebro y la piel. En este último caso, el enfoque se centra en cómo la dieta puede influir en la microbiota de la piel, un aspecto que aún no se comprende bien. Varias publicaciones han destacado el papel significativo de las vitaminas, antioxidantes y otras moléculas tienen en el mantenimiento de una barrera cutánea saludable, facilitando procesos antiinflamatorios y previniendo enfermedades cutáneas asociadas a microorganismos (Zhang y col., 2021b; Mahmud y col., 2022).

Las branquias juegan un papel crucial en el intercambio gaseoso y la defensa de los peces. Una dieta adecuada respalda un tejido branquial bien estructurado, mejora la composición del moco y proporciona una mejor protección contra infecciones patógenas (Mansour y col., 2020; Firmino y col., 2020). Sin embargo,

los efectos de la dieta en la piel y las branquias en la acuicultura son aspectos que aún están escasamente tratados y que sin duda requieren una mayor investigación.

Nuestro grupo de investigación ha estado analizando los efectos de diferentes dietas funcionales, en las que se incluían algas o probióticos, en peces cultivados (Tapia-Paniagua y col., 2012; Cerezuela y col., 2013; Tapia-Paniagua y col., 2020; Cerezo y col., 2022). *Nannochloropsis* sp. es una microalga conocida por su abundancia en minerales, antioxidantes y compuestos que tienen beneficios potenciales para los peces (Scholz y col. 2014; Zhang y col., 2021a). En este sentido, estudios previos han explorado principalmente sus efectos fisiológicos y comerciales (Vizcaíno y col., 2018; Sales y col., 2021; Sáez y col., 2022). Cerezo-Ortega y col. (2021), estudiaron los efectos de la suplementación dietética de *N. gaditana* en la microbiota y la barrera intestinal de *S. aurata*. Los autores mostraron que ninguna de estas características se vio alteradas, y más concretamente, no se encontraron diferencias en la taxonomía y la funcionalidad de la microbiota intestinal (Cerezo-Ortega y col., 2021).

En estudios previos, se ha evaluado el impacto de la incorporación de la cianobacteria *Arthrospira* sp. en la dieta de alevines y juveniles de dorada, donde no se observaron efectos negativos en cuanto al rendimiento del crecimiento o la utilización de nutrientes, sino que al contrario se produjeron efectos beneficiosos sobre la fisiología de los peces, como fueron la oxidación de lípidos y la pigmentación de la piel (Galafat y col., 2020; Galafat y col., 2022). Igualmente, se ha descrito que las ficobiliproteínas y ficocianina de *A. platensis* exhiben efectos inhibidores frente bacterias patógenas (Sarada y col., 2011; Najdenski y col. 2013; Sun y col., 2016). Si bien existen resultados previos que sugieren que el consumo de *Arthrospira* sp. como alimento para peces no induce disbiosis intestinal (Plaza y col., 2019; Rosenau y col., 2021), no se ha determinado el impacto que en la composición de la microbiota de la piel puede tener la inclusión en la dieta de esta cianobacteria.

La piel y las branquias de los peces representan microhábitats distintos que albergan comunidades bacterianas específicas asociadas con funciones fisiológicas en el hospedador (Guivier y col., 2020). Sin embargo, la mayoría de las técnicas analíticas se centran en el análisis de la composición de los taxones presentes, dejando sin explorar las interacciones dentro de la comunidad microbiana. Las redes de coocurrencia ofrecen un enfoque diferente y complementario para el estudio de la composición taxonómica de la microbiota

(Barberán y col. 2012; Wolff y col., 2017). Al analizar los patrones de abundancia de los distintos microorganismos, estas redes proporcionan información sobre las relaciones entre ellos, que pueden estar vinculadas a interacciones bióticas potenciales, especialmente en respuesta a diferentes tratamientos o entornos. Este enfoque nos permite obtener información a múltiples escalas, que van desde la escala global del ecosistema, a la escala mesoscópica dentro del mismo, hasta la escala local individual. Por ejemplo, la topología de las redes inferidas se puede utilizar para evaluar la estabilidad y robustez de todo el ecosistema, mientras que la estructura de la comunidad revela módulos funcionales que lo componen. A escala local, los patrones de conectividad entre microorganismos individuales pueden proporcionar información valiosa (Guseva y col., 2022).

El objetivo de este estudio ha sido analizar como la alimentación funcional con *Arthrhopira* sp. y *Nannochloropsis* sp. en individuos de *S. aurata* afecta a las propiedades estructurales de las comunidades bacterianas asociadas a mucosas en órganos alejados del intestino (piel y branquias), empleando una metodología basada en el análisis taxonómico y de redes de coocurrencia, adaptados a las características de estas agrupaciones bacterianas

2. Material y métodos

2.1. Preparación del alimento

Los piensos comerciales para dorada utilizadas en este experimento fueron elaborados en las instalaciones del CEIA3-Universidad de Almería (Servicio de Piensos Experimentales, http://www.ual.es/stecnicos_spe, Tabla 1) y sirvieron como dieta de control (Control). Además, se compusieron dos dietas experimentales con un 70 % de biomasa de *Arthrhopira* sp. y un 30 % de biomasa de *Nannochloropsis* sp., mezcla incorporada a la dieta en una concentración del 10%. La primera, conocida como dieta cruda, utiliza la biomasa en su estado natural. La segunda dieta, denominada como dieta hidrolizada, implica someter la misma biomasa a hidrólisis enzimática utilizando una mezcla de proteasas comerciales (Alcalase 2.4 L® y Flavourzyme 1000 L® de Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) bajo condiciones controladas. Estos compuestos fueron suministrados por LifeBioencapsulation S.L. (Almería, España) y son productos concentrados liofilizados que contienen 800 g/kg de cada mezcla.

Tabla 1. Composición de ingredientes de las dietas experimentales utilizadas en el ensayo de alimentación. La dieta Cruda contiene un 5% de biomasa de microorganismos crudos y la dieta Hidrolizada un 5% de biomasa de microorganismos hidrolizados.

Ingredientes (% materia seca)	Dieta Control	Dieta Cruda	Dieta Hidrolizada
Harina de pescado LT94 ¹	15,0	15,0	15,0
Lisina ²	1,2	1,2	1,2
Metionina ²	0,5	0,5	0,5
Harina de calamar ³	1,0	1,0	1,0
Hidrolizado de proteína de pescado ⁴	0,5	0,5	0,5
Producto microbiano ⁵		10,0	10,0
Gluten de trigo ⁶	15,0	13,0	13,0
Proteína de soja concentrada ⁷	35,0	33,0	33,0
Aceite de pescado ⁸	5,0	4,5	4,5
Aceite de soja ⁹	8,0	7,2	7,2
Lecitina de soja ¹⁰	1,0	1,0	1,0
Harina de trigo ¹¹	12,7	8,0	8,0
Cloruro de colina ¹²	0,5	0,5	0,5
Betaína ¹³	0,5	0,5	0,5
Premezcla de vitaminas y minerales ¹⁴	2,0	2,0	2,0
Vitamina C ¹⁴	0,1	0,1	0,1
Goma guar ¹⁵	2,0	2,0	2,0
Composición proximal (% materia seca)			
Proteína cruda (%)	44,3	44,6	44,0
Lípidos crudos (%)	14,3	14,6	13,9
Cenizas (%)	6,0	5,8	5,9

¹(proteínas: 69,4 %; lípidos: 12,3%), Norsildemel (Bergen, Noruega); ²Suysegala (Sevilla, España); ³Bacarel (Reino Unido); ⁴CPSP (Sopropêche, Francia); ⁵Lifebioencapsulation SL (Almería, España); ⁶(proteínas: 76,0%; lípidos: 1,9%), Lorca Nutrición Animal (Murcia, España); ⁷(proteínas: 50,0%; lípidos: 1,0%) Lorca Nutrición Animal (Murcia, España); ⁸AFAMPES 117DHA (AFAMSA, España); ⁹Aceites el Niño (Málaga, España); ¹⁰Lecico P700 (Lecico GmbH, DE); ¹¹(proteínas: 12,0%; lípidos: 2,0%), proveedor local; ^{12,13}Sigma-Aldrich (Madrid, España); ¹⁴Vitaminas (UI o mg kg⁻¹ de premezcla): vitamina A (acetato de retinilo), 2000000 UI; vitamina D3 (DL-colecalciferol), 200000 UI; vitamina E, 10000 mg; vitamina K3 (bisulfito sódico de menadiona), 2500 mg; vitamina B1 (clorhidrato de tiamina), 3000 mg; vitamina B2 (riboflavina), 3000 mg; pantotenato de calcio, 10000 mg; ácido nicotínico, 20000 mg; vitamina B6 (clorhidrato de piridoxina), 2000 mg; vitamina B9 (ácido fólico), 1500 mg; vitamina B12 (cianocobalamina), 10 mg; vitamina H (biotina), 300 mg; inositol, 50.000 mg; betaína, 50.000 mg; vitamina C (ácido ascórbico), 50.000 mg. Minerales (mg kg⁻¹ premezcla): Co (carbonato de cobalto), 65 mg; Cu (sulfato cúprico), 900 mg; Fe (sulfato de hierro), 600 mg; I (yoduro de potasio), 50 mg; Mn (óxido de manganeso), 960 mg; Se (selenita de sodio), 1 mg; Zn (sulfato de zinc) 750 mg; Ca (carbonato de calcio), 186.000 mg; KCl, 24.100 mg; NaCl 40.000 mg; excipiente sepiolita, sílice coloidal (premezcla LifeBioencapsulation); ¹⁵ EPSCA (Sevilla, España).

Los ingredientes del pienso y los aditivos se mezclaron, y luego se añadió agua (hasta 300 g/kg) para lograr una masa homogénea en una mezcladora de cinta helicoidal vertical (Sammic BM-10, Sammic, Azpeitia, España). La masa se pasó por un extrusor de laboratorio de dos tornillos (Evoluum 25 Clextral, Francia) para producir pellets con un diámetro de 5 mm. Los detalles de esta metodología se describieron en Molina-Roque y col. (2022).

2.2. Diseño del experimento y muestreo

Los juveniles de dorada (*S. aurata*) fueron proporcionados por una fuente comercial (CUPIBAR, Chiclana de la Frontera, Cádiz) y aclimatados a las instalaciones experimentales cubiertas en los Servicios Centrales de Investigación en Cultivos Marinos (SCI-CM, CASEM, Universidad de Cádiz, Puerto Real, Cádiz, España) con agua de mar en condiciones controladas de salinidad (36 g/L), temperatura (19 °C), y bajo fotoperíodo natural. Los ensayos de alimentación fueron realizados bajo la supervisión de técnicos especializados.

Antes de introducir las dietas experimentales, los peces pasaron por un período de aclimatación de 10 días con la dieta de control en las unidades experimentales del SCI-CM. Los piensos se administraron una vez al día (10:30 a.m.) hasta la saciedad aparente, asegurando que la cantidad ofrecida en cada unidad experimental fuera completamente consumida. Posteriormente, se utilizaron las tres dietas experimentales descritas anteriormente en un ensayo de alimentación durante 41 días, que involucró un total de 108 peces con una masa corporal media inicial de $182,5 \pm 1,8$ g. Los peces fueron pesados individualmente y distribuidos al azar en 9 tanques de 400 L de capacidad ($N = 12$ peces/tanque; densidad de población inicial $5,47 \pm 0,06$ kg/m³) manteniéndose durante todo el período experimental en un sistema con circuito abierto como se describió previamente por Molina-Roque y col. (2022). La prueba de alimentación se realizó a ciegas, de modo que los tres piensos fueron etiquetados con diferentes colores pero sin hacer referencia a su composición, eliminando cualquier fuente de subjetividad al alimentar a los animales.

No se registró mortalidad en ningún grupo experimental. Al finalizar el ensayo de alimentación de 41 días, se realizó un muestreo final, en el cual se seleccionaron al azar 6 ejemplares de cada dieta experimental (2 peces/tanque) después de un ayuno nocturno, se anestesiaron profundamente con una dosis letal de 2-fenoxietanol, y luego se pesaron y midieron individualmente. El resto de los individuos se utilizaron para otros análisis. Los peces fueron seccionados

cervicalmente para obtener biopsias de diferentes tejidos en condiciones estériles. Para la posterior caracterización de la microbiota a partir de branquias y piel, se guardaron muestras de estos tejidos a -80°C hasta su procesamiento.

2.3. Extracción y secuenciación de ADN mediante tecnología Illumina Miseq

Las muestras individuales de branquias y piel de *S. aurata*, almacenadas a -80 °C, fueron descongeladas gradualmente sobre hielo y el contenido de moco fue extraído mediante presión hacia los extremos con un objeto estéril. El ADN de ambas secciones intestinales se extrajo según el protocolo descrito por Martínez y col., (1998) basado en precipitación salina, con modificaciones (Tapia-Paniagua y col., 2010). La concentración del ADN se cuantificó fluorométricamente con el kit de ensayo de ADN de doble cadena Qubit™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y la pureza, calidad e integridad del ADN se midió mediante métodos espectrofotométricos y electroforéticos para estudiar el grado de pureza, calidad e integridad del ADN. El ADN aislado se almacenó a -20 °C hasta su posterior procesamiento y empleándose 30 ng para análisis posteriores. El ADNr 16S fue secuenciado en la plataforma Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) con secuenciación pareada de extremo 2 × 250 bp en el Servicio de Ultrasecuenciación de Novogene Europe (Cambridge, Reino Unido). La secuenciación se realizó utilizando los cebadores 341F y 806R dirigidos a las regiones variables V3-V4 del gen ADNr 16S (5' CCTAYGGGRBGCASCAG 3' y 5' GGACTACNNGGTATCTAAT 3' respectivamente) (Klindworth y col., 2013; Thijs y col., 2017). Se eliminaron los cebadores y se realizó un control de calidad con el programa cutadapt y FastQC (Andrews y col., 2010). Los amplicones secuenciados se procesaron utilizando la librería R DADA2 (Callahan y col., 2016). Las lecturas pareadas se ensamblaron después de modelar y corregir errores, creando variantes de secuencia de amplicón (ASV). Las ASV quiméricas se eliminaron mediante reconstrucción contra ASV parentales más abundantes. Se asignó la taxonomía utilizando la base de datos SILVA (versión 138), agrupada al 99% de identidad y recortada a la región amplificada. La abundancia de ASV de la microbiota intestinal se procesó utilizando *phyloseq* (McMurdie and Holmes 2013) y la librería *vegan* (Oksanen, 2017) del programa estadístico R. Se calcularon los índices de diversidad alfa de Shannon y Simpson para evaluar la diversidad taxonómica y se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) utilizando el cálculo de Unifrac ponderado para examinar la diversidad beta. Para probar las diferencias significativas entre los índices de diversidad alfa, se

llevó a cabo la prueba estadística *t student* ($p < 0,05$), y para conocer las diferencias significativas entre las distancias de PCoA entre tratamientos, se calcularon PERMANOVA. Las ASV con una abundancia menor a 10 lecturas en al menos el 10% de las muestras fueron filtradas para análisis taxonómicos. La librería de R *ggplot2* se utilizó para representar la abundancia de las diferentes categorías taxonómicas y la abundancia diferencial entre los taxones se llevó a cabo utilizando el paquete R *DESeq2* con una tasa de falso descubrimiento $< 0,05$.

Para la creación de las redes, se utilizó la tabla de abundancias obtenida a partir de los análisis taxonómicos. Se eliminaron todas aquellas ASV que no aparecían en al menos la mitad más uno de las muestras del tratamiento y del tejido estudiado. De esta manera, se obtuvo una tabla que garantiza que las ASV presentes son las que predominan en la mayoría de las muestras.

2.4. Análisis de redes complejas

Construcción de las redes: Se consideraron los ASV como los nodos de la red, mientras que las uniones ilustran la correlación entre ellos. Las redes de coocurrencia se construyeron con base en la correlación de *Spearman*, inferida de las abundancias de las ASV, a partir de la función *rcorr()* de la biblioteca *Hmisc* en R. Solo consideramos las correlaciones de *Spearman* estadísticamente significativas ($p < 0,01$) y con $q > |0,60|$ (Barberán y col. 2012). Para evaluar la microbiota autóctona, en el análisis solo se consideraron los ASV presentes en más de la mitad de las muestras, para cada dieta y tejido. Se obtuvieron 6 redes de coocurrencia, es decir, 3 para cada tejido y una para cada dieta (control, hidrolizada y cruda): red de branquias-control (GC), red de branquias-hidrolizadas (GH), red de branquias-cruda (GR), red de control de piel (SC), red de piel hidrolizada (SH) y red de piel cruda (SR). Las redes fueron visualizadas en Cytoscape (versión 3.9.1) (Liu y col., 2022).

Métricas básicas de las redes: Los parámetros topológicos de la red descritos en la Tabla 2 se calcularon utilizando el módulo *NetworkX* en *Python* con nuestro propio código. En particular, se calculó el número de nodos N , el número de enlaces M , densidad de la red ρ , número de vecinos promedio $\langle k \rangle$, la longitud de ruta característica $\langle l \rangle$ y el coeficiente de agrupamiento promedio $\langle C \rangle$ (Newman 2003).

La densidad de la red (ρ) se define como la relación entre el número de enlaces existentes y el número de enlaces posibles, y por lo tanto está limitada entre 0 y

1, siendo 0 una red vacía y 1 una red donde todos los enlaces posibles están presentes.

$$\rho = \frac{2M}{N(N-1)}$$

El número promedio de vecinos en una red ($\langle k \rangle$), es la media de los grados de todos los nodos, donde el grado del nodo es i , y k_i , se define como el número de enlaces adyacentes a un nodo; y donde M representa el número total de enlaces de la red.

$$\langle k \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N k_i = \frac{2M}{N}$$

La longitud media del camino característico es el promedio de las distancias más cortas entre todos los pares de nodos en la red. El camino de longitud $\langle l \rangle$ en una red se define como un conjunto ordenado de nodos $\{n_i, i=1,2,\dots,l\}$ en la que todos los enlaces del conjunto $\{(n_i, n_{i+1}), i=1,2,\dots,l-1\}$ existen en la red. Por lo tanto, la longitud media del camino característico se obtiene sumando las longitudes de los caminos más cortos entre todos los pares de nodos, y dividiendo entre el número total de pares de nodos en la red. Cada par de nodos tiene una distancia más corta específica l_{ij} , que conecta los nodos i y j . Esta medida calcula cuántos “saltos” se deben hacer, en promedio, para llegar a un nodo desde cualquier otro nodo de la red. Para esta métrica solo se tomó los nodos que se encontraban en el componente conectado más grande de la red

$$\langle l \rangle = \frac{2}{N(N-1)} \sum_{\{i,j\}} l_{ij}$$

El coeficiente de agrupamiento promedio se define como la media, para todos los nodos de la red, de la proporción de conexiones entre los vecinos de un nodo y el número total posible de conexiones entre ellos. Por ejemplo, esta métrica evalúa cuánto tienden a agruparse los nodos de una red o, en otros términos, la probabilidad de que, si un nodo está conectado a otros dos nodos, estos otros nodos también se encuentren conectados.

$$\langle C \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{2 \# \text{connections among neighbours of } n_i}{k_i(k_i-1)},$$

Randomización de la red. Para evaluar la aleatoriedad de la estructura de la red, comparamos la longitud del camino característico y el coeficiente de agrupamiento promedio con un modelo nulo. Para este fin, utilizamos el modelo de configuración que, dada la secuencia de grados de la red original, proporciona un conjunto de redes que mantiene la secuencia de grados pero se ensambla al

azar (Newman, 2003). Para la comparación, se utilizaron 100 aleatorizaciones del modelo y se reportaron los valores promedio y desviaciones estándar de las métricas.

Estructura comunitaria y roles estructurales. Se calculó la estructura comunitaria de las redes utilizando el programa Radatools (<https://deim.urv.cat/~sergio.gomez/radatools.php>). Se utilizó este programa dado que implementa el método de detección de comunidades descrito en Gómez y col. (2009), que calcula la modularidad teniendo en cuenta los signos de los enlaces en la red, lo que permite crear una partición significativa de los nodos, que resulta en la ordenación de los nodos en diferentes grupos (Gómez y col., 2009). Se investigó la estructura mesoscópica analizando la diversidad de géneros en cada grupo utilizando el índice de Shannon. Valores bajos indicarían que los ASV en el conjunto de datos tienden a organizarse en comunidades del mismo género.

También se caracterizaron los roles de los ASV en la red respecto a la organización mesoscópica aplicando la metodología de Guimerà y Amaral (2005). Para hacerlo, primero se calculó un valor para cada nodo i , denominado z_i , que representa el z-score para la distribución de grados dentro del grupo. Esto mide qué tan bien conectado está el nodo i en comparación con los nodos del mismo agrupamiento o *cluster*. k_i representa el número de conexiones del nodo i a otros nodos del mismo agrupamiento; k_{si} es el número promedio de conexiones de los nodos en el mismo *cluster* a otros nodos en el mismo modulo y $\sigma_{k_{si}}$ es la desviación estándar k dentro del *cluster*.

$$Z_i = \frac{k_i - \bar{k}_{s_i}}{\sigma_{k_{s_i}}}$$

Por otro lado, se calculó el coeficiente de participación para cada i , que mide cómo un nodo distribuye sus conexiones entre los diferentes agrupamientos. Cuando este coeficiente es cercano a 0, todos sus enlaces caen en su propio grupo, mientras que cuando está cerca de 1, los enlaces se distribuyen equitativamente entre los grupos. En particular, N_M está definido como el número total de *clusters*, k_{is} es el grado del i dentro del módulo s y k_i es el grado total del i .

$$P_i = 1 - \sum_{s=1}^{N_M} \left(\frac{k_{is}}{k_i} \right)^2$$

Esta metodología es capaz de detectar núcleos (“hubs”) y conectores en las redes en función de los valores de ambas cantidades previamente definidos. Se consideran “núcleos” de la red, aquellos que tienen un grado alto (alto z_i) y conectan muchos *clusters* diferentes (alto P_i) y los conectores son los que conectan muchos agrupamientos diferentes (alto P_i), pero con un grado no tan grande (Guimera and Nunes-Amal, 2005).

2.5. Declaración del comité de ética

El experimento *in vivo* fue realizado bajo la responsabilidad de la Universidad de Cádiz (España) siguiendo las directrices para procedimientos experimentales en investigación con animales del Comité de Ética y Bienestar Animal de esta universidad, según los principios publicados en la Directiva Europea Animal (2010/63/UE) y la legislación española (Real Decreto RD53/2013) para la protección de los animales utilizados en experimentos científicos. Además, el Comité Ético de la Junta de Andalucía aprobó los experimentos (número de referencia Junta de Andalucía 16/16/2019/170).

2.6. Disponibilidad de datos y material

Los archivos FASTQ sin procesar están actualmente disponibles en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) bajo los accesos Bioproyectos PRJNA986101 y PRJNA985893.

3. Resultados

3.1. Análisis taxonómico de la composición de la microbiota

Las lecturas de las secuencias se procesaron para rectificar posibles errores instrumentales (para obtener información detallada, consulte la Tabla Suplementaria 1), lo que resultó en lecturas de alta calidad. En promedio de todas las muestras se contabilizaron $107\,651,69 \pm 19\,285,76$ lecturas, con un mínimo de 41 228 lecturas y un máximo de 1 361 377 lecturas. En las muestras de piel y branquias se crearon un total de 2 238 y 2 324 variantes de secuenciación única (ASV) que fueron identificadas con un 99% de umbral de identidad, respectivamente.

El análisis de diversidad alfa de la microbiota estudiada no reveló diferencias estadísticamente significativas en el índice de Shannon entre las diferentes dietas,

tanto en las muestras de branquias como en las de piel (Tabla 2; *t* de Student > 0,05).

El análisis de coordenadas principales (PCoA) no indicó ninguna agrupación entre muestras (Figura Suplementaria 1). El análisis PERMANOVA basado en la distancia UniFrac ponderada tampoco reveló diferencias significativas entre los grupos ($p = 0,24$)

Tabla 2. Índices de diversidad de Shannon y Simpson de la microbiota asociada a branquias y piel en los tratamientos de estudio Control (C), Crudo (R) e Hidrolizado (H). Media $\pm$ DE, no se encontraron diferencias significativas (*t* de student, $p < 0,05$)

Tejido	Tratamiento	Índice de Shannon			Índice de Simpson		
Branquias	Control	5,78	$\pm$	0,63	0,99	$\pm$	0,01
	Hidrolizada	5,46	$\pm$	1,10	0,98	$\pm$	0,01
	Cruda	5,78	$\pm$	0,54	0,99	$\pm$	0,01
Piel	Control	5,49	$\pm$	0,19	0,91	$\pm$	0,01
	Hidrolizada	5,52	$\pm$	0,05	0,91	$\pm$	0,01
	Cruda	5,39	$\pm$	0,22	0,91	$\pm$	0,02

El análisis taxonómico mostró que el filo dominante en branquias fue *Proteobacteria*, seguido de *Bacteroidota*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*. En muestras de piel, las proteobacterias constituyeron aproximadamente el 90% de la microbiota, mientras que *Bacteroidota*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* estuvieron presentes en menor abundancia (Figura suplementaria 2). A nivel de género, las branquias exhibieron una mayor diversidad de géneros en comparación con la piel. Los géneros más abundantes en branquias fueron *Polaribacter*, *Actinobacter*, *Shewanella* y *Acinetobacter* (Figura 1A) y en piel, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (Figura 1B).

El análisis de comparación por pares utilizando el algoritmo *DESeq2* reveló diferencias significativas entre los taxones del grupo Control y Cruda en comparación con los obtenidos frente al grupo de dieta Hidrolizada. En la microbiota asociada a branquias, el grupo Control mostró un aumento del género *Enterobacter*, mientras que el grupo de dieta Cruda presentó mayor abundancia de *Shewanella*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* y *Citrobacter*. Por el contrario, las muestras de piel mostraron un mayor número de alteraciones en la microbiota asociados a ASV con baja abundancia, que fueron significativamente diferentes entre los grupos Control y Cruda (Figura Suplementaria 3).

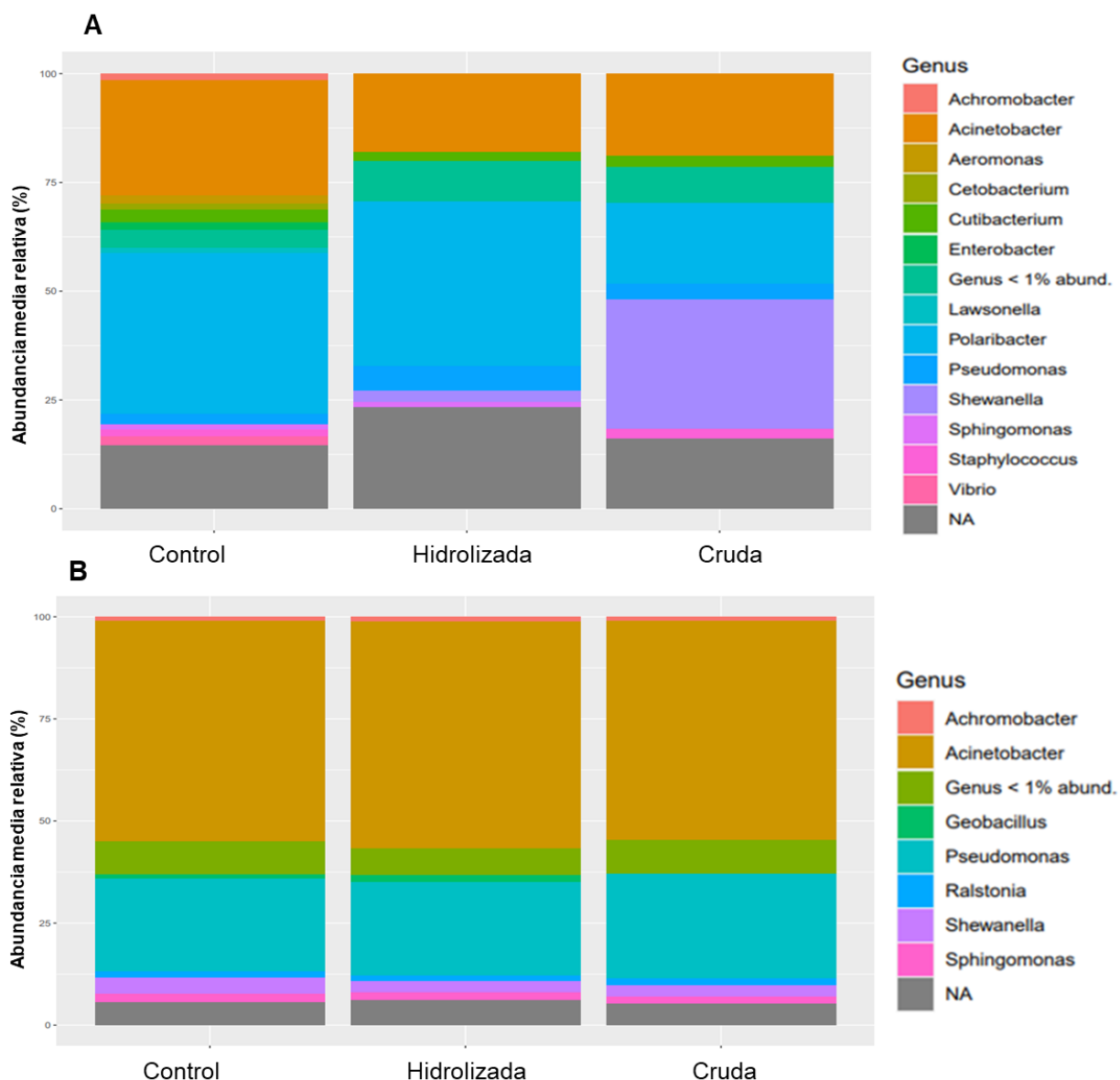


Figura 1. Abundancia relativa a nivel de género en la microbiota (A) branquial y (B) cutánea de los peces. NA indica ASV que no estaban agrupados taxonómicamente a nivel de género dentro de la base de datos. ETC < 1% indica el sumatorio de la abundancia relativa inferior al 1%.

3.2. Análisis de redes de coocurrencia ASV

Se construyeron redes de coocurrencia basadas en la correlación de la abundancia o presencia de diferentes microorganismos en cada muestra. Estas redes proporcionan información sobre las posibles comunidades microbianas y sus funciones en un entorno determinado. Se calcularon las medidas principales de la red junto con su topología, que se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 3. Topología de las redes de ASV de la microbiota asociada a branquias y piel en cada una de las dietas ensayadas. Los resultados obtenidos tras aleatorizar la red 100 veces, siguiendo la distribución de grados de cada red individual, se presentan entre paréntesis.

	Branquias			Piel		
	Control (GC)	Hidrolizada (GH)	Cruda (GR)	Control (SC)	Hidrolizada (SH)	Cruda (SR)
Número de nodos	243	168	219	174	175	158
Número de enlaces	5880	2559	4714	474	817	327
Promedio de número de los vecinos	77,06	38,76	57,01	5,87	9,33	4,27
Densidad de redes	0,19	0,18	0,19	0,03	0,05	0,03
Longitud de camino característico	1,74 (2,01±0,00)	2,19 (1,98±0,00)	2,31 (2,03±0,00)	9,25 (3,24±0,04)	6,18 (3,74±0,05)	7,91 (2,62±0,01)
Coefficiente de agrupamiento	0,89 (0,35±0,01)	0,78 (0,24±0,01)	0,84 (0,32±0,01)	0,49 (0,04±0,01)	0,60 (0,02±0,01)	0,39 (0,06±0,01)
% Enlaces negativos	40,58%	30,31%	15,43%	38,5%	29,6%	24,9%

La red de coocurrencia del grupo control (GC) fue la más grande (mayor número de nodos) encontrada en las branquias, con 243 ASV, en comparación con las redes encontradas en la dieta cruda (GR) con 219 ASV y la dieta hidrolizada (GH) con 168 ASV. En términos de número de enlaces, la red GC fue la que tuvo el mayor número, mientras que la red GH tuvo la menor cantidad de conexiones. Sin embargo, las tres redes de branquias exhibieron densidades similares. Más de la mitad de las uniones de la red de microbiota del tejido branquial fueron positivos, y la red de GH mostró la mayor proporción de enlaces positivos. Las redes GC y GR mostraron el coeficiente de agrupación más alto (0,89 y 0,84 respectivamente). Aunque la red GC estaba más densamente conectada, tuvo los valores más bajos para la longitud de ruta característica (1,74) y la densidad de la red (0,19), debido a la presencia de varios grupos aislados completamente conectados que aumentaron el número de enlaces. La red GH tuvo una longitud de ruta característica alta (2,19), una centralidad de red baja (0,18) y el coeficiente de agrupación más bajo (0,78). Esta red fue la menos compacta, mostrando una baja interdependencia entre los organismos coexistentes. La red GR tuvo los valores más altos para la longitud del camino característico (2,31) y la densidad de la red (0,19).

Las redes de coocurrencia cutáneas, mostraron un menor número de ASV en comparación con las branquias. Al igual que en branquias, la red de piel en la dieta hidrolizada (SH) fue la red más pequeña, con 158 nodos, mientras que las redes del grupo control (SC) y de dieta cruda (SR) tenían 174 y 175 ASV,

respectivamente (Tabla 2). El análisis de las uniones de la red reveló un número significativamente mayor de conexiones en la red con dieta cruda (817 enlaces), en comparación con las redes del grupo control y con dieta hidrolizada con 474 y 327 uniones respectivamente. Se destacó la red SR con una densidad de red de 0,05. A pesar del número limitado de enlaces en la red con la dieta hidrolizada, su densidad (0,03), equivalente a la obtenida con la dieta control (0,03). La red SR se destacó por su composición como un único componente conectado, en contraste con los 9 grupos en la red SC y los 11 en la red SH.

La fracción de enlaces únicos por dieta varió dependiendo del tejido. En las branquias, los nodos que solo se conectaban una única vez representaron más del 60 % para cada dieta (3 698/5 880 en control, 2 486/4 714 en cruda y 1 413/2 559 en hidrolizada), mientras que, en la piel las uniones exclusivas supusieron alrededor del 90% de los enlaces para cada dieta (419/474 en control, 757/817 en cruda y 301/327 en dieta hidrolizada). En ambos tejidos, la dieta hidrolizada exhibió la red con la proporción más baja de uniones únicas, en comparación con las dietas control y cruda (Figura Suplementaria 4).

3.3. Análisis de comunidad

El análisis de modularidad se realizó utilizando un algoritmo que considera las conexiones positivas y negativas, revelando la presencia de comunidades distintas. En las branquias, las comunidades consistían en grupos altamente conectados de organismos filogenéticamente relacionados (Figura 2, Tabla 4). Específicamente, los miembros del género *Acinetobacter* exhibieron diferentes patrones de coexistencia independientemente de la dieta. Por el contrario, los ASV dentro del género *Polaribacter* participaban predominantemente en relaciones de coexclusión con otros grupos en diferentes condiciones. Además, los miembros de los filos *Cutibacterium*, *Cetobacterium* y *Staphylococcus* formaron grupos aislados dentro de la red.

La microbiota de la piel mostró una mayor diversidad comunitaria en comparación con la microbiota branquial (Figura 3). Además, se observó que las redes de piel exhibían una menor conectividad, lo que sugiere interacciones microbianas más débiles. En particular, el taxón bacteriano *Polaribacter* estaba ausente en la red de la piel. A pesar de tener una cantidad similar de ASV, las comunidades de piel eran menos densas en comparación con las branquias.

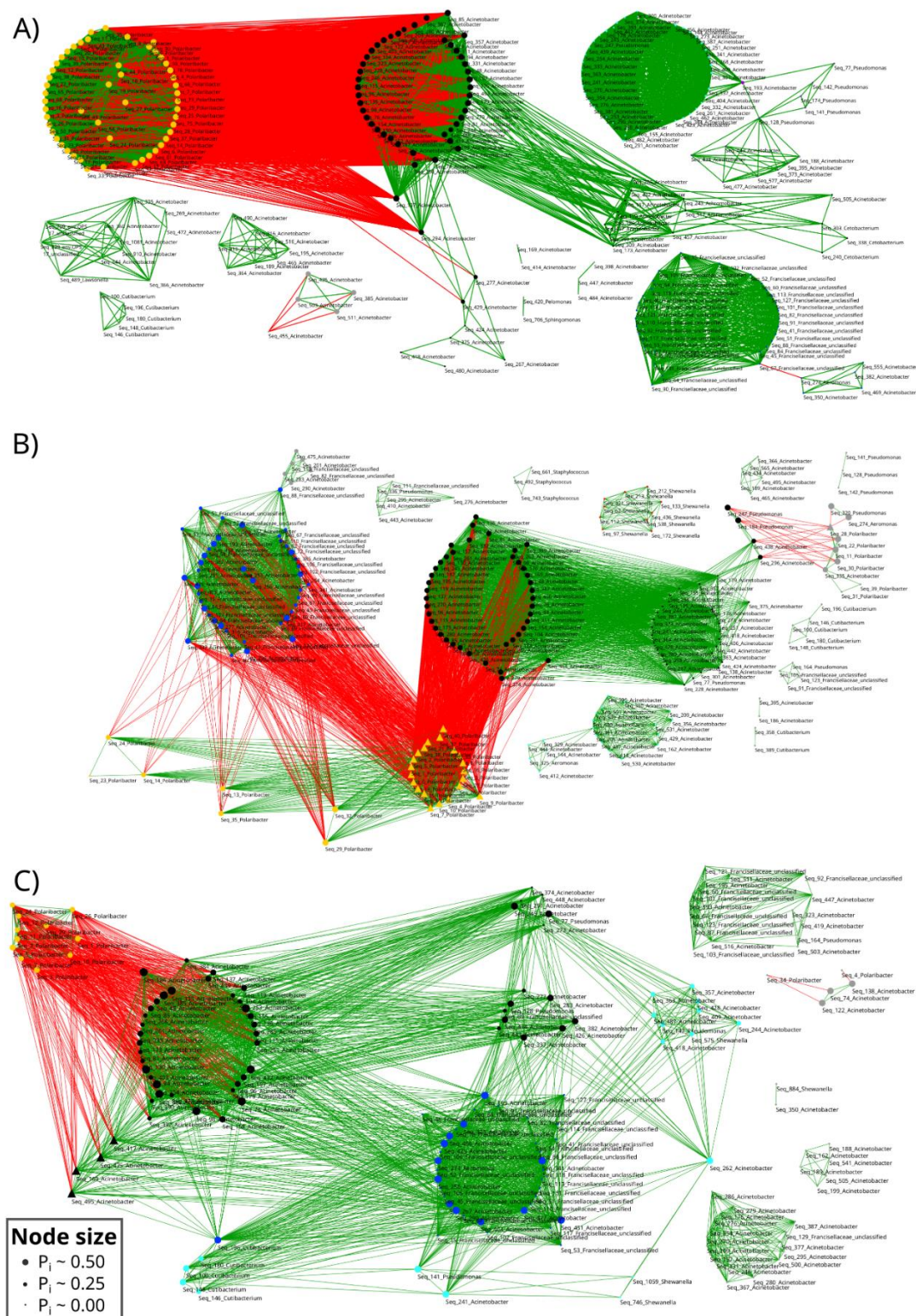


Figura 2. Red de coocurrencia de ASV en branquias, calculada para los grupos de estudio (A) Control, (B) Cruda y (C) Hidrolizado por separado. Los nodos se colorean según el algoritmo de la comunidad y el tamaño se calcula según el valor P_i . Los enlaces están coloreados según el tipo de correlación (verde: positivo; rojo: negativo) y la forma triangular representa valores de $P_i < 0.62$. Para una visualización más detallada y de alta calidad de la figura, se puede acceder al siguiente enlace:

<https://drive.google.com/file/d/1LV4SPoM8c3Km8t72EeSgpstuAfVK9N1I/view>

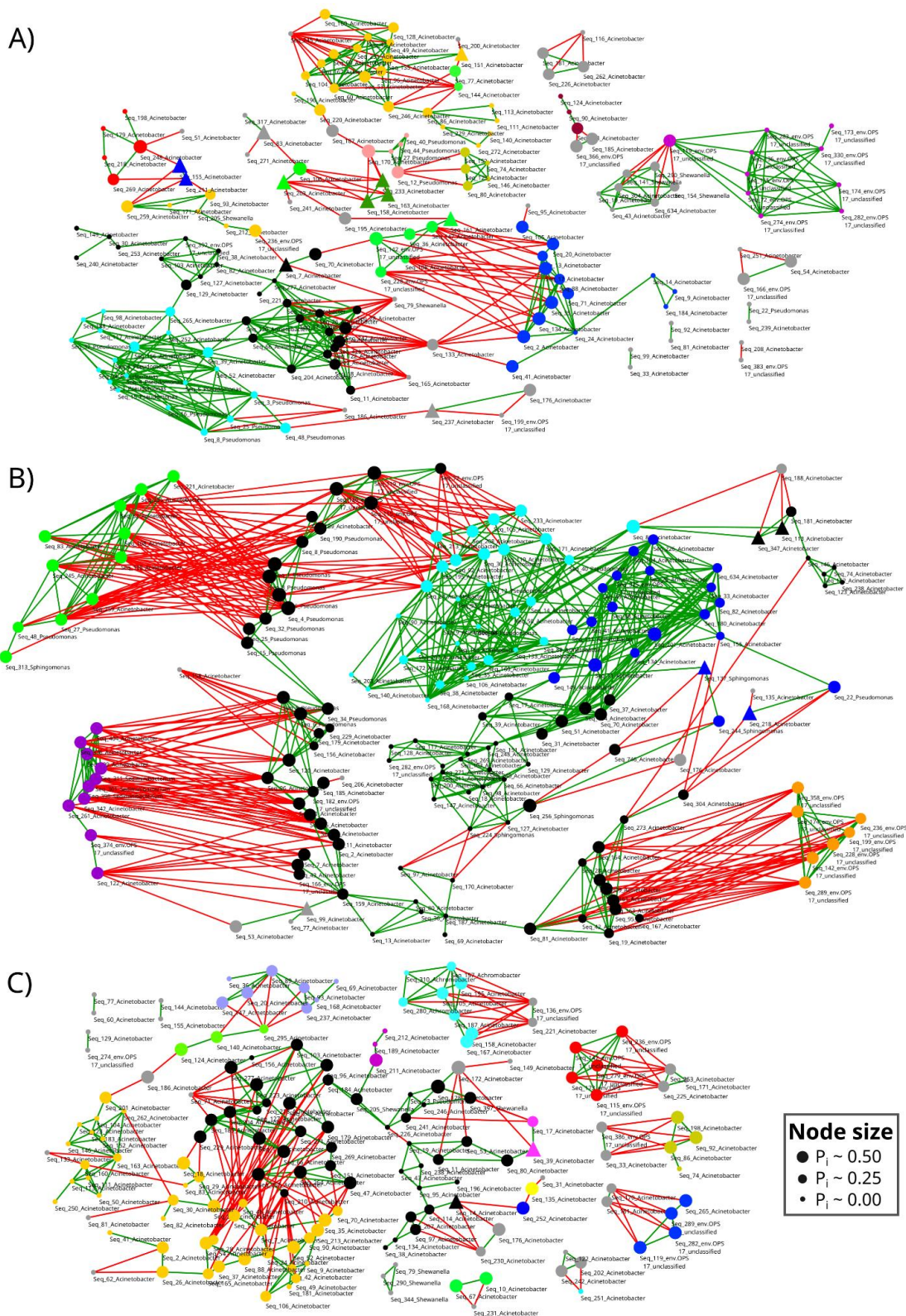


Figura 3. Red de coocurrencia de ASV en la piel, calculada para los grupos de estudio (A) Control, (B) Cruda y (C) Hidrolizado por separado. Los nodos se colorean según el algoritmo de la comunidad y el tamaño se calcula según el valor P_i . Los enlaces están coloreados según el tipo de correlación (verde: positivo; rojo: negativo) y la forma triangular representa valores de $P_i < 0,62$. Para una visualización más detallada y de alta calidad de la figura, se puede acceder al siguiente enlace: <https://drive.google.com/file/d/15AF1aYe1RFpw3FsP9HfpXT5EjivVNaq/view>

Tabla 4. Índice de Shannon de comunidades de redes por tratamiento y tejido (media $\pm$ DE)

Índices de Shannon de Comunidades	Control	Cruda	Hidrolizada
Branquias	0,26 $\pm$ 0,40	0,23 $\pm$ 0,40	0,39 $\pm$ 0,58
Piel	0,17 $\pm$ 0,37	0,35 $\pm$ 0,50	0,11 $\pm$ 0,30

Se utilizó el cálculo ZiPi-plot para identificar conectores de red, que son nodos que conectan diferentes módulos dentro de una red (Figura 4). Los conectores desempeñan un papel crucial en la capacidad de una red para conectar y desconectar módulos. GC no mostró conectores en la red de microbiomas branquiales. Sin embargo, un grupo de *Polaribacter* (comunidad amarilla, Figura 2B) apareció como conectores en la red del grupo que recibió la dieta cruda (GR), con un valor de $P_i > 0,62$. En el mismo tejido, la red GH tenía solo tres ASV del género *Acinetobacter* que podrían considerarse como conectores (Figura 4A).

En el análisis de la piel, la presencia de conectores no difirió entre los grupos de control y tratamiento, lo que indica una estructura de conectividad similar (Figura 4B).

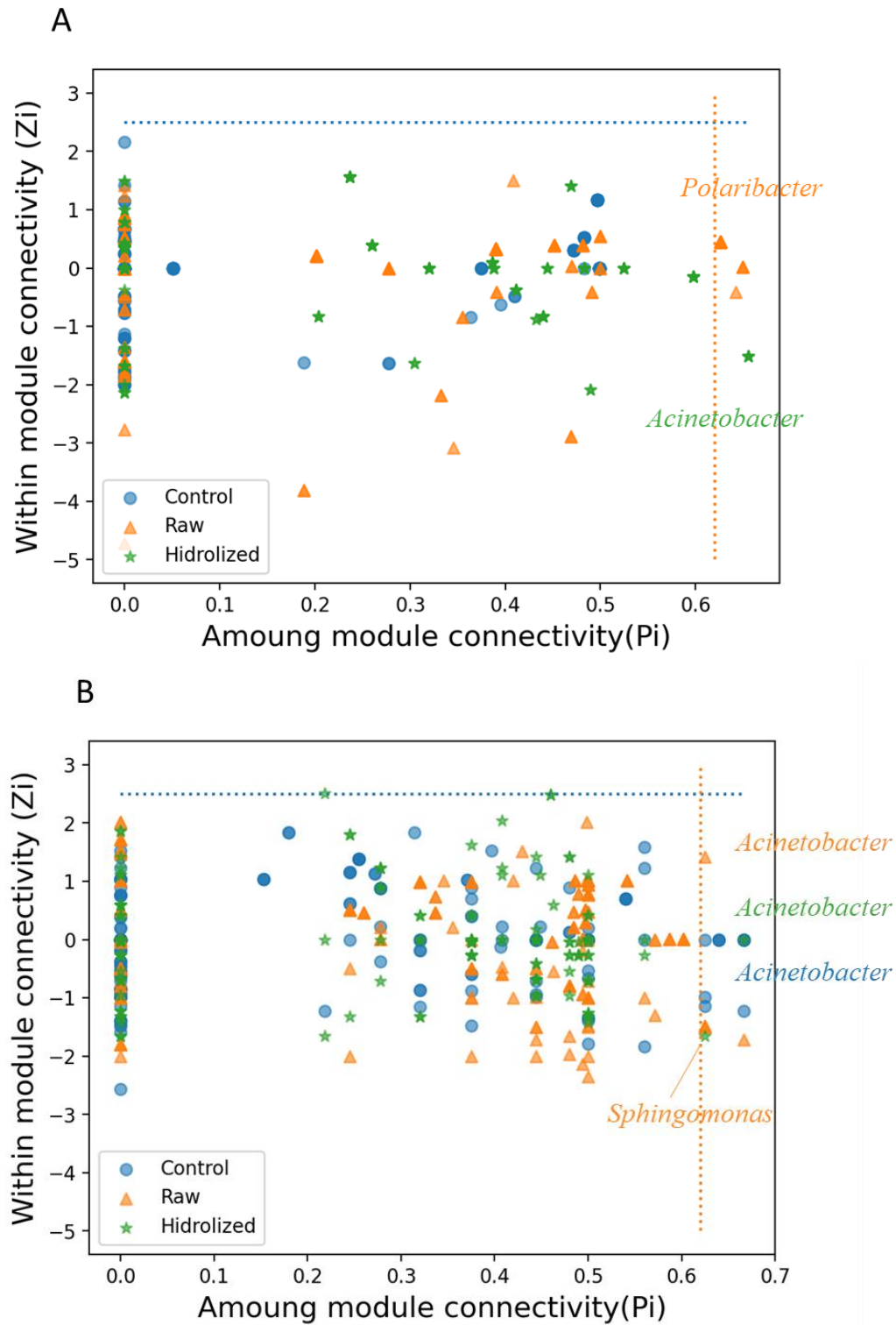


Figura 4. Gráfico ZiPi que muestra la distribución de ASV según sus funciones topológicas basadas en módulos para (A) branquias y (B) piel de la microbiota asociada con *Sparus aurata*. Los puntos azules representan grupos de control, los naranjas para crudos y los verdes para hidrolizados.

4. Discusión

El interés en las microalgas y cianobacterias como ingredientes o aditivos en los alimentos para peces está aumentando en los últimos años, debido a los potentes efectos antioxidantes, antimicrobianos e inmunoestimulantes que se han confirmado en los peces de acuicultura que recibieron dietas funcionales (Heredia y col., 2021; Kavitha y col., 2021). Sin embargo, algunas especies de microalgas tienen paredes celulares gruesas y ricas en celulosa que constituyen un obstáculo para la extracción de compuestos bioactivos intracelulares, lo que bien podría disminuir su biodisponibilidad y digestibilidad (Heredia y col., 2021). Recientemente, se ha comprobado que un pretratamiento enzimático de estas células aumentaba la biodisponibilidad de ciertos metabolitos con efectos potencialmente bioactivos y funcionales y aunque en estudios previos realizados *in vivo* en dorada no han demostrado el impacto de esta estrategia en parámetros como el crecimiento de los peces, la permeabilidad intestinal y la composición de la microbiota, si se ha encontrado que mejora el estado oxidativo de los lípidos musculares y los cambios en el color de la piel (Sáez y col., 2022).

Si bien los análisis de la microbiota de la piel y las branquias a menudo enfatizan la presencia de alteraciones causadas por factores ambientales, la influencia de la dieta en estas comunidades microbianas sigue estando poco estudiada. La piel y las branquias son órganos muy expuestos, fundamentales para proteger a los organismos de daños físicos e infecciones (Dishaw y col., 2017; Dash y col., 2018). Las dietas deben aportar componentes esenciales para la estructura celular, la composición y la abundancia de la mucosa, favoreciendo el bienestar de la microbiota. Los cambios sutiles en la composición de la microbiota a menudo se pasan por alto o se consideran insignificantes, pero incluso alteraciones menores pueden tener efectos sustanciales en las interacciones microbianas.

A nivel taxonómico, *Proteobacteria* fue el filo más abundante tanto en la piel como en los tejidos branquiales, seguido de *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*, lo que coincide con los resultados obtenidos por otros estudios (Rosado y col., 2018). A nivel de género, los peces tratados mostraron una disminución de *Enterobacter* y un aumento significativo de *Staphylococcus* y *Shewanella* en la microbiota branquial. Se sabe que las especies de *Staphylococcus* contribuyen a la salud de las branquias al producir enzimas que degradan compuestos dañinos como el nitrito (Götz y col., 2006), que pueden afectar la función de las branquias (Trevisan y col., 2012). Por su parte, *Shewanella* se encontró como un clado aislado en la red GR y GH. El género *Shewanella* contiene una cepa que ha sido aislada de dorada

cultivada sana y se ha utilizado como probiótico encontrando efectos beneficiosos a nivel de la piel (Cámara-Ruiz y col., 2020; Cerezo y col., 2023).

Las diferencias en la microbiota de la piel no fueron tan pronunciadas en comparación con las branquias. El análisis de red destacó los distintos patrones en la estructura y las interacciones de las comunidades microbianas, que pueden no ser evidentes únicamente a través del perfil taxonómico tradicional.

A nivel topológico global, las redes branquiales fueron aproximadamente cuatro veces más densas que las redes cutáneas, lo que indica una microbiota bacteriana más compacta y resiliente en las branquias. Las redes branquiales exhibieron un valor de longitud de ruta característica comparable a las aleatorizaciones, sugiriendo una estructura de red de “pequeño-mundo” con distancias cortas entre los nodos. Por el contrario, el valor de longitud de camino característicos de las redes de piel fue entre dos y tres veces superior a los derivados de las aleatorizaciones, lo que indica una estructura de red menos resiliente y más lineal. La mayor densidad y las características de las redes branquiales de “pequeño-mundo” sugieren una estructura altamente conectada y funcionalmente redundante (Allison y Martiny, 2008), que puede ser difícil de alterar mediante la eliminación de ASV, mejorando así la resiliencia ante las extinciones. Por otro lado, las redes de piel también mostraron un coeficiente de agrupamiento promedio alto, lo que indica un alto nivel de redundancia, pero la longitud de ruta característica más larga sugiere una estructura de red más vulnerable. Los distintos patrones globales en la piel y las redes branquiales pueden atribuirse a los diferentes entornos y funciones de estos dos tejidos, teniendo las branquias una mayor diversidad de nichos.

Se observó que todas las redes exhibieron una fuerte estructura modular, lo que indica un alto nivel de organización a nivel mesoscópico. La estructura por comunidades surgió de la distribución de uniones positivas y negativas en la red, donde las relaciones positivas indicaban abundancias sincronizadas o interacciones ecológicas positivas como cooperación, mutualismo o comensalismo, mientras que las relaciones negativas indicaban efectos opuestos o interacciones ecológicas negativas como competencia o amensalismo (Guseva y col., 2022; Pinto y col., 2022).

Los módulos estrechamente conectados con relaciones positivas, que consisten en ASV en su mayoría del mismo género, sugieren, como señalamos antes, un alto nivel de redundancia funcional, con todos los ASV dentro del módulo participando en procesos similares y sin competencia. La conexión de dos de

estos módulos por relaciones negativas, sugiere una exclusión competitiva entre los módulos, donde los ASV de diferentes grupos se superponen en funciones y compiten entre sí. Las redes branquiales se adaptan a esta interpretación altamente estructurada, mientras que las redes cutáneas exhibieron una distribución más dispersa de interacciones negativas, lo que resultó en una fragmentación de la red en módulos menos densos. Esto sugiere una mayor presión de selección, que resulta en una menor diversidad de nichos en la microbiota de la piel.

Al examinar las funciones de red de los ASV utilizando gráficos ZiPi plots, se observó que no había “núcleos” en ninguna de las redes, lo que indica una distribución de grados homogénea dentro de los módulos. Esto sugiere además un alto nivel de redundancia funcional dentro de los módulos branquiales. En términos de conectores ($P_i > 0,62$), la dieta modificaba la estructura de la red en branquias, existiendo conectores que no estaban presentes en la dieta de control. Sin embargo, en las redes cutáneas no se apreciaron cambios cualitativos en la conectividad entre las dietas, con los mismos conectores presentes en todas ellas. En las branquias, el género de los conectores dependió de la dieta (*Polaribacter* para la dieta cruda y *Acinetobacter* para la dieta hidrolizada) sirviendo como taxones clave que establecían conexiones y desconexiones entre módulos. Es probable que estos conectores desempeñen un papel importante en la estabilidad y la dinámica de la comunidad microbiana branquial, fomentando la comunicación y la cooperación entre diversos grupos de microorganismos. En las redes cutáneas, los conectores siempre correspondieron a ASV del género *Acinetobacter*. La presencia de conectores en todas las dietas de las redes cutáneas se puede atribuir a la estructura lineal de las redes, con enlaces negativos dispersos por todas partes.

En las redes branquiales, observamos un comportamiento regulatorio entre los grupos de *Polaribacter* y *Acinetobacter*. *Polaribacter* se encontró en peces de control (hasta un 36%), mientras que *Acinetobacter* se encontró en un 26% de la abundancia total. *Polaribacter* se ha detectado en gran medida en las branquias de la lubina y en la piel de la dorada, respectivamente. *Polaribacter* no se considera una bacteria patógena para los peces y se ha descrito que tiene una función esencial en la descomposición de la materia orgánica (Abell and Bowman, 2005).

Acinetobacter, por otro lado, es un género asociado con enfermedades oportunistas en peces que puede afectar a la piel y las branquias. La abundancia de *Acinetobacter* puede verse influenciada por factores como el estrés, condiciones

ambientales deficientes, inmunosupresión o lesiones físicas (Mougin and Joyce, 2023). Numerosas especies de *Acinetobacter* han sido conocidas por la formación de biopelículas (Gedefie y col., 2021; Sahoo y col., 2015), lo que puede contribuir a la formación de grupos altamente conectados con interacción positiva en redes de coocurrencia (Goberna y col., 2019), como se muestra claramente en nuestras redes branquiales. Esta condición es similar en la dieta hidrolizada, donde *Polaribacter* mantuvo la misma abundancia que en la situación de control, pero *Acinetobacter* y la familia *Francisellaceae* comparten el mismo módulo. Miembros de la familia *Francisellaceae* puede conducir a franciselosis en peces, una enfermedad que afecta la piel, los órganos internos y la vejiga natatoria de los peces infectados (Birkbeck y col., 2011). Parece que *Polaribacter* puede proporcionar cierta protección potencial frente a posibles patógenos en peces, como lo demuestran las interacciones negativas con patógenos potenciales (Poudel y col., 2016; Guseva y col., 2022). Además, *Polaribacter* puede degradar compuestos orgánicos complejos, como polisacáridos y sustancias antimicrobianas. Por el contrario, *Polaribacter* experimentó una disminución en su abundancia en las branquias de los peces que se alimentaron con la dieta cruda. *Acinetobacter* mostró interacciones positivas con la familia *Francisellaceae* y otros ASV de *Acinetobacter*, y apareció un nuevo grupo formado por *Pseudomonas*. *Pseudomonas* es un género que contiene cepas patógenas que pueden causar enfermedades en condiciones específicas (Berthe y col., 1995; Altinok y col., 2006; Ashley 2007; Yan y col., 2022). Algunas especies del género *Pseudomonas* producen sustancias antibacterianas que pueden inhibir o reducir la presencia de otras bacterias, incluidos los miembros de *Polaribacter*, a través de mecanismos como la competencia por recursos, la producción de metabolitos tóxicos o la interferencia con el crecimiento bacteriano y la formación de biopelículas (González y col., 2008; Guillonnetau y col., 2018). Además, algunos investigadores han encontrado una disminución de *Polaribacter* en la piel y branquias de *Dicentrarchus labrax* infectados con *Photobacterium damsela* (Rosado y col., 2019), por lo que se intuye que podría ocurrir un proceso infeccioso, directa o indirectamente, cuando se influye en la abundancia de *Polaribacter*. Sin embargo, debido a la limitada información disponible sobre *Polaribacter* en comparación con *Acinetobacter*, se necesita más investigación para comprender las interacciones que regulan estos módulos para el bienestar del individuo.

Diversos factores como la dieta, las enfermedades y el estrés, pueden inducir cambios en el sistema inmunitario, la estabilidad de la barrera cutánea y/o la composición y cantidad de las secreciones mucosas de la piel, que afectan la

constitución de la microbiota cutánea (Merrifield and Rodiles, 2015; Reverter y col., 2018). En este estudio, los cambios en la microbiota de la piel fueron sutiles y las redes de la piel mostraron diferencias estructurales menores. Desafortunadamente, existe una falta información sobre si esta estructura de la red cutánea podría ser beneficiosa o perjudicial para el huésped. Estudios previos en piel humana han demostrado que la conectividad y la estabilidad de la red se reducen en el caso de patologías dermatológicas (Park y col., 2017). Leung y col., (2020) demostraron que las mejillas afectadas por el acné exhibían una estabilidad estructural de la red reducida, lo que sugiere que la integridad de la red microbiana reducida es una propiedad general asociada con los trastornos de la piel. Por el contrario, los mismos autores sugirieron que una red sólida y estable puede proteger la salud cutánea (Leung y col., 2020). En el presente trabajo no se investigó el efecto de las enfermedades de la piel; en cambio, se examinó el efecto directo o indirecto de las dietas sobre la piel sana. La microbiota cutánea diversa puede proporcionar más redundancia funcional y flexibilidad, lo que permite al huésped adaptarse mejor a los cambios ambientales. Debido a la novedad de este estudio, no se dispone de información comparable, pero futuras investigaciones podrían implicar infecciones experimentales o inducir daños en la piel para evaluar el efecto de diferentes estructuras de red resultantes de las dietas.

Aunque este estudio proporciona una descripción completa de los cambios estructurales en las redes de coexistencia microbiana en branquias y piel de *S. aurata*, tiene varias limitaciones. En primer lugar, el pequeño número de individuos ($N = 6$) limita el poder estadístico para estudiar las correlaciones, y los experimentos futuros deberían incluir un tamaño de muestra mayor. En segundo lugar, es importante señalar que las correlaciones no proporcionan evidencia directa de interacciones bióticas (Pinto y col., 2022). En particular, el tipo de interacción competitiva es difícil de inferir y diferenciar con métodos basados en correlación, como utilizamos en este artículo (Dallas y col., 2019). En tercer lugar, el análisis sólo consideró los ASV presentes en al menos la mitad de las muestras más uno, sin tener en cuenta el resto de ASV, debido a que los taxones raros son difíciles de manejar, ya que su aparición en los datos está fuertemente influenciada por el esfuerzo de muestreo. Sin embargo, se espera que los taxones raros tengan un impacto mínimo en la estructura y función generales de las redes. Por último, los datos proporcionaron una representación estática de la estructura de las redes de coocurrencia microbiana, y sus abundancias e interacciones son dinámicas, lo que requiere el estudio de series temporales de muestras

individuales. Debido a la naturaleza *in vivo* de los experimentos, que implicaron el sacrificio de los individuos durante el muestreo, esta limitación es difícil de superar.

En el futuro, comprender la estructura de las redes microbianas y sus cambios debido a la dieta podría servir para obtener una relevante información para el diseño de estrategias encaminadas a la prevención y el manejo de enfermedades, identificar biomarcadores y contribuir a un conjunto más amplio de conocimientos en los campos de la nutrición y la fisiología desde una perspectiva de microbiota interactómica. Es crucial el uso de algoritmos que consideren la naturaleza de las relaciones en redes microbianas, como se demuestra en este estudio. Además, estudiar el impacto de las dietas en las branquias y la piel puede proporcionar información sobre las funciones fisiológicas generales y mejorar la comprensión de la compleja relación entre nutrición, microbiota y salud.

En resumen, nuestro estudio reveló que las dietas utilizadas en este experimento no produjeron cambios pronunciados en la composición de la microbiota de la piel y las branquias, pero hubo diferencias interesantes entre las redes de interacción bacteriana. Los distintos patrones globales en la piel y las redes branquiales están influenciados por diferentes entornos y funciones, siendo en las branquias donde se encontró una mayor diversidad de nichos. Las redes branquiales exhiben una estructura altamente conectada y redundante, lo que mejora la resiliencia, mientras que las redes cutáneas muestran una estructura más fragmentada, que indica una susceptibilidad potencial a las perturbaciones. *Acinetobacter* y *Polaribacter* surgieron como taxones clave, que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad y funcionalidad general de la comunidad microbiana de *S. aurata*. En particular, *Polaribacter* mostró una posible función protectora en las branquias contra patógenos en base a las interacciones negativas observadas.

Referencias

- Abell, G. C. J., & Bowman, J. P. (2005). Colonization and community dynamics of class *Flavobacteria* on diatom detritus in experimental mesocosms based on Southern Ocean seawater. *FEMS Microbiology Ecology*, 53(3), 379-391. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.01.008>
- Allison, S. D., & Martiny, J. B. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(supplement_1), 11512-11519. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801925105>
- Althoff, T., Nilforoshan, H., Hua, J., & Leskovec, J. (2022). Large-scale diet tracking data reveal disparate associations between food environment and diet. *Nature communications*, 13(1), 267. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27522-y>
- Altinok, I., Kayis, S., & Capkin, E. (2006). *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. *Aquaculture*, 261(3), 850-855. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.009>
- Ashley, P. J. (2007). Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied animal behaviour science*, 104(3-4), 199-235. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.09.001>
- Bajaj, J. S. (2019). Alcohol, liver disease and the gut microbiota. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(4), 235-246. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0099-1>
- Barberán, A., Bates, S. T., Casamayor, E. O., & Fierer, N. (2012). Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME journal*, 6(2), 343-351. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.119>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.C.C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G.H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J.A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., Mitter, B., Ryan, M., Sarand, I., Smidt, H., Schelkle, B., Roume, H., Kiran, G.S., Selvin, J., Souza, R.S.C., Van Overbeek, L., Singh, B.K., Wagner, M., Walsh, A., Sessitsch, A. & Schlöter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8, 1-22. <https://doi.org/10.1186/S40168-020-00875-0>
- Berthe, F. C., Michel, C., & Bernardet, J. F. (1995). Identification of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from several fish species in France. *Diseases of aquatic organisms*, 21(2), 151-155.
- Birkbeck, T. H., Feist, S. W., & Verner-Jeffreys, D. W. (2011). *Francisella* infections in fish and shellfish. *Journal of fish diseases*, 34(3), 173-187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01226.x>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Cámara-Ruiz, M., Balebona, M. C., Moriñigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2020). Probiotic *Shewanella putrefaciens* (SpPdp11) as a fish health modulator: a review. *Microorganisms*, 8(12), 1990. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8121990>
- Cerezo, I. M., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S. T., Bautista, R., Anguís, V., Fernández-Díaz, C., Alarcón, J.A., Moriñigo, M. A. & Balebona, M. C. (2022). *Solea senegalensis* bacterial intestinal microbiota is affected by low dietary inclusion of *Ulva ohnoi*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 801744. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.801744>

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

Cerezo-Ortega, I. M., Di Zeo-Sánchez, D. E., García-Márquez, J., Ruiz-Jarabo, I., Sáez-Casado, M. I., Balebona, M. C., Moriñigo M. A. & Tapia-Paniagua, S. T. (2021). Microbiota composition and intestinal integrity remain unaltered after the inclusion of hydrolysed *Nannochloropsis gaditana* in *Sparus aurata* diet. *Scientific Reports*, 11(1), 18779. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98087-5>

Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S. T., Meseguer, J., Moriñigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2013). Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. *Fish & shellfish immunology*, 34(5), 1063-1070. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.015>

Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148(6), 1258-1270. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.01.035>

Dallas, T., Melbourne, B. A., & Hastings, A. (2019). When can competition and dispersal lead to checkerboard distributions?. *Journal of animal ecology*, 88(2), 269-276. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12913>

Dash, S., Das, S. K., Samal, J., & Thatoi, H. N. (2018). Epidermal mucus, a major determinant in fish health: a review. *Iranian journal of veterinary research*, 19(2), 72.

Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*, 54(9), 2325-2340. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>

Firmino, J. P., Vallejos-Vidal, E., Sarasquete, C., Ortiz-Delgado, J. B., Balasch, J. C., Tort, L., Estevez, A. & Gisbert, E. (2020). Unveiling the effect of dietary essential oils supplementation in *Sparus aurata* gills and its efficiency against the infestation by *Sparicotyle chrysophrii*. *Scientific reports*, 10(1), 17764. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74625-5>

Galafat, A., Vizcaíno, A. J., Sáez, M. I., Martínez, T. F., Arizcun, M., Chaves-Pozo, E., & Alarcón, F. J. (2022). Assessment of dietary inclusion of crude or hydrolysed *Arthrospira platensis* biomass in starter diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 548, 737680. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2021.737680>

Galafat, A., Vizcaíno, A. J., Sáez, M. I., Martínez, T. F., Jérez-Cepa, I., Mancera, J. M., & Alarcón, F. J. (2020). Evaluation of *Arthrospira* sp. enzyme hydrolysate as dietary additive in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Journal of Applied Phycology*, 32, 3089-3100. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02141-0>

Gibney, M. J., & Forde, C. G. (2022). Nutrition research challenges for processed food and health. *Nature Food*, 3(2), 104-109. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00457-9>

Guimera, R., & Nunes Amaral, L. A. (2005). Functional cartography of complex metabolic networks. *Nature*, 433(7028), 895-900. <https://doi.org/10.1038/nature03288>

Gómez, S., Jensen, P., & Arenas, A. (2009). Analysis of community structure in networks of correlated data. *Physical review E*, 80(1), 016114. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.80.016114>

- González, J. M., Fernández-Gómez, B., Fernández-Guerra, A., Gómez-Consarnau, L., Sánchez, O., Coll-Lladó, M., Del Campo, J., Escudero, L., Rodríguez-Martínez, R., Alonso-Sáez, L., Latasa, M., Paulsen, I., Nedashkovskaya, O., Lekunberri, I., Pinhassi, J., Pedrós-Alió, C. (2008). Genome analysis of the proteorhodopsin-containing marine bacterium *Polaribacter* sp. MED152 (*Flavobacteria*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(25), 8724-8729. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712027105>
- Götz, F., Bannerman, T., & Schleifer, K. H. (2006). The genera *staphylococcus* and *macrococcus*. *The prokaryotes*, 5. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_1
- Guillonnet, R., Baraquet, C., Bazire, A., & Molmeret, M. (2018). Multispecies biofilm development of marine bacteria implies complex relationships through competition and synergy and modification of matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 9, 390047. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01960>
- Guivier, E., Pech, N., Chappaz, R., & Gilles, A. (2020). Microbiota associated with the skin, gills, and gut of the fish *Parachondrostoma toxostoma* from the Rhône basin. *Freshwater biology*, 65(3), 446-459. <https://doi.org/10.1111/FWB.13437>
- Guseva, K., Darcy, S., Simon, E., Alteio, L. V., Montesinos-Navarro, A., & Kaiser, C. (2022). From diversity to complexity: Microbial networks in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 169, 108604. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2022.108604>
- Heredia, V., Pruvost, J., Gonçalves, O., Drouin, D., & Marchal, L. (2021). Lipid recovery from *Nannochloropsis gaditana* using the wet pathway: Investigation of the operating parameters of bead milling and centrifugal extraction. *Algal Research*, 56, 102318. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102318>
- Kavitha, S., Gajendran, T., Saranya, K., Selvakumar, P., & Manivasagan, V. (2021). Study on consolidated bioprocessing of pre-treated *Nannochloropsis gaditana* biomass into ethanol under optimal strategy. *Renewable Energy*, 172, 440-452. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2021.03.015>
- Kelly, C., & Salinas, I. (2017). Under pressure: interactions between commensal microbiota and the teleost immune system. *Frontiers in immunology*, 8, 271125. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00559>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1-e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Leeming, E. R., Johnson, A. J., Spector, T. D., & Le Roy, C. I. (2019). Effect of diet on the gut microbiota: rethinking intervention duration. *Nutrients*, 11(12), 2862. <https://doi.org/10.3390/nu11122862>
- Leung, M. H., Tong, X., Bastien, P., Guinot, F., Tenenhaus, A., Appenzeller, B. M., Betts, R.J., Mezzache S., Li, J., Bourokba, N., Breton, L., Clavaud, C., Lee, P.K.H. (2020) Changes of the human skin microbiota upon chronic exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants. *Microbiome*, 8, 1-17. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00874-1>
- Liu, S., Chen, H., Ma, W., Zhong, Y., Liang, Y., Gu, L., & Li, J. (2022). Non-coding RNAs and related molecules associated with form-deprivation myopia in mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(1), 186-194. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17071>

- Mahmud, M. R., Akter, S., Tamanna, S. K., Mazumder, L., Esti, I. Z., Banerjee, S., Akter, S., Hasan, M.R., Acharjee, M., Hossain, M.S., Pirttilä, A.M. (2022). Impact of gut microbiome on skin health: gut-skin axis observed through the lenses of therapeutics and skin diseases. *Gut Microbes*, 14(1), 2096995. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2096995>
- Mansour, A. T., Espinosa, C., García-Beltrán, J. M., Miao, L., Ceballos Francisco, D. C., Alsaqufi, A. S., & Esteban, M. Á. (2020). Dietary supplementation of drumstick tree, *Moringa oleifera*, improves mucosal immune response in skin and gills of seabream, *Sparus aurata*, and attenuates the effect of hydrogen peroxide exposure. *Fish physiology and biochemistry*, 46, 981-996. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00763-2>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Merrifield, D. L., & Rodiles, A. (2015). *The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. In Mucosal health in aquaculture* (273-295). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00010-8>
- Molina-Roque, L., Bárany, A., Sáez, M. I., Alarcón, F. J., Tapia, S. T., Fuentes, J., Mancera, J.M., Perera, E., & Martos-Sitcha, J.A. (2022) Biotechnological treatment of microalgae enhances growth performance, hepatic carbohydrate metabolism and intestinal physiology in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles close to commercial size. *Aquaculture Reports*, 25, 101248. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101248>
- Mougin, J., & Joyce, A. (2023). Fish disease prevention via microbial dysbiosis-associated biomarkers in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 15(2), 579-594. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12745>
- Najdenski, H.M., Gigova, L.G., Iliev, I.I., Pilarski, P.S., Lukavský, J., Tsvetkova, I.V., Ninova, M.S., & Kussovski, V.K. (2013). Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *International journal of food science & technology*, 48(7), 1533-1540. <https://doi.org/10.1111/IJFS.12122>
- Newman, M. E. (2003). The structure and function of complex networks. *SIAM review*, 45(2), 167-256. <https://doi.org/10.1137/S003614450342480>
- Oksanen J (2017) Vegan: ecological diversity. R Package Version 2.4-4 1:11
- Park, T., Kim, H. J., Myeong, N. R., Lee, H. G., Kwack, I., Lee, J., Kim, B.J., Sul, W.J., & An, S. (2017) Collapse of human scalp microbiome network in dandruff and seborrheic dermatitis. *Experimental dermatology*, 26(9), 835-838. <https://doi.org/10.1111/EXD.13293>
- Pinto, S., Berincà, E., van Nes, E. H., Scheffer, M., & Bogaards, J. A. (2022). Species abundance correlations carry limited information about microbial network interactions. *PLoS computational biology*, 18(9), e1010491. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010491>
- Plaza, I., García, J. L., Galán, B., De la Fuente, J., Bermejo-Poza, R., & Villarroel, M. (2019). Effect of *Arthrospira* supplementation on *Oreochromis niloticus* gut microbiota and flesh quality. *Aquaculture Research*, 50(5), 1448-1458. <https://doi.org/10.1111/are.14020>
- Poudel, R., Jumpponen, A., Schlatter, D. C., Paulitz, T. C., Gardener, B. M., Kinkel, L. L., & Garrett, K. A. (2016). Microbiome networks: a systems framework for identifying candidate microbial assemblages for disease management. *Phytopathology*, 106(10), 1083-1096. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-16-0058-FI>

- Requena, T., Martínez-Cuesta, M. C., & Peláez, C. (2018). Diet and microbiota linked in health and disease. *Food & function*, 9(2), 688-704. <https://doi.org/10.1039/c7fo01820g>
- Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P. (2018). Biological and ecological roles of external fish mucus: a review. *Fishes*, 3(4), 41. <https://doi.org/10.3390/FISHES3040041>
- Rosado, D., Pérez-Losada, M., Severino, R., Cable, J., & Xavier, R. (2018). Characterization of the skin and gill microbiomes of the farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*) and seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 500, 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.063>
- Rosado, D., Xavier, R., Severino, R., Tavares, F., Cable, J., & Pérez-Losada, M. (2019). Effects of disease, antibiotic treatment and recovery trajectory on the microbiome of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Scientific Reports*, 9(1), 18946. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55314-4>
- Rosenau, S., Oertel, E., Mott, A. C., & Tetens, J. (2021). The effect of a total fishmeal replacement by *Arthrospira platensis* on the microbiome of african catfish (*Clarias gariepinus*). *Life*, 11(6), 558. <https://doi.org/10.3390/life11060558>
- Sáez, M. I., Galafat, A., Vizcaíno, A. J., Chaves-Pozo, E., Ayala, M. D., Arizcun, M., Alarcón F.J., Suárez D.M., & Martínez, T. F. (2022). Evaluation of *Nannochloropsis gaditana* raw and hydrolysed biomass at low inclusion level as dietary functional additive for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 556, 738288.
- Sales, R., Galafat, A., Vizcaíno, A. J., Sáez, M. I., Martínez, T. F., Cerón-García, M. C., Navarro-López, E., Tsuzuki, M.Y., Acién-Fernández, F.G., Molina-Grima, E., & Alarcón, F. J. (2021). Effects of dietary use of two lipid extracts from the microalga *Nannochloropsis gaditana* (Lubián, 1982) alone and in combination on growth and muscle composition in juvenile gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Algal research*, 53, 102162.
- Santesso, N., Akl, E. A., Bianchi, M., Mente, A., Mustafa, R., Heels-Ansdell, D., & Schünemann, H. J. (2012). Effects of higher-versus lower-protein diets on health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *European journal of clinical nutrition*, 66(7), 780-788. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2012.37>
- Sarada, D. V., Sreenath Kumar, C., & Rengasamy, R. (2011). Purified C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler: a novel and potent agent against drug resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 779-783. <https://doi.org/10.1007/S11274-010-0516-2>
- Scholz, M. J., Weiss, T. L., Jinkerson, R. E., Jing, J., Roth, R., Goodenough, U., Posewitz, M.C., & Gerken, H. G. (2014). Ultrastructure and composition of the *Nannochloropsis gaditana* cell wall. *Eukaryotic cell*, 13(11), 1450-1464. <https://doi.org/10.1186/S12967-017-1175-Y>
- Simons, A. (2010). A quality control tool for high throughput sequence data. *A quality control tool for high throughput sequence data*, 10, www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc
- Sun, Y., Chang, R., Li, Q., & Li, B. (2016). Isolation and characterization of an antibacterial peptide from protein hydrolysates of *Spirulina platensis*. *European Food Research and Technology*, 242, 685-692. <https://doi.org/10.1007/S00217-015-2576-X/>
- Tapia-Paniagua, S. T., Balebona, M. D. C., Firmino, J. P., Rodríguez, C., Polo, J., Moriñigo, M. A., & Gisbert, E. (2020). The effect of spray-dried porcine plasma on gilthead seabream (*Sparus aurata*) intestinal microbiota. *Aquaculture nutrition*, 26(3), 801-811. <https://doi.org/10.1111/anu.13039>

- Tapia-Paniagua, S. T., Díaz-Rosales, P., León-Rubio, J. M., García de La Banda, I., Lobo, C., Alarcón, F. J., Chabrilón, M., Rosas-Ledesma, P., Varela, J.L., Ruiz-Jarabo, I., Arijó, S., Esteban, M.A., Martínez-Manzanares, E., Mancera, J.M., Balebona, M.C., & Moriñigo, M. A. (2012). Use of the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on the culture of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) and gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture international*, 20, 1025-1039.
- Thijs, S., Op De Beeck, M., Beckers, B., Truyens, S., Stevens, V., Van Hamme, J. D., Weyens, N.; & Vangronsveld, J. (2017). Comparative evaluation of four bacteria-specific primer pairs for 16S rRNA gene surveys. *Frontiers in microbiology*, 8, 494. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00494>
- Trevisan, R., Arl, M., Sacchet, C. L., Engel, C. S., Danielli, N. M., Mello, D. F., Brocardo, C., Maris, A.F., Luiz & Dafre, A. L. (2012). Antioxidant deficit in gills of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to chlorodinitrobenzene increases menadione toxicity. *Aquatic toxicology*, 108, 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.09.023>
- Vizcaíno, A. J., Sáez, M. I., Martínez, T. F., Acien, F. G., & Alarcón, F. J. (2019). Differential hydrolysis of proteins of four microalgae by the digestive enzymes of gilthead sea bream and Senegalese sole. *Algal research*, 37, 145-153. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.018>
- Wolff, S. M., Ellison, M. J., Hao, Y., Cockrum, R. R., Austin, K. J., Baraboo, M., Burch, K., Lee, H.J., Maurer, T., Patil, R., Ravelo, A., Taxis, T.M., Truong, H., Lamberson, W.R., Cammack, K.M., & Conant, G. C. (2017). Diet shifts provoke complex and variable changes in the metabolic networks of the ruminal microbiome. *Microbiome*, 5, 1-15.
- Yan, L., Jin, D., Yang, S., Li, X., Li, H., Hu, S., Sun, Y., Yi, G.F., Wang, P., Rang, J. & Xia, L. (2022) Pathogenicity of fish pathogen *Pseudomonas plecoglossicida* and preparation of its inactivated vaccine. *Microbial Pathogenesis*, 166, 105488. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105488>
- Zhang, C., Li, R., Feng, Y., Zhang, L., Zhao, C., Ji, C., & Cui, H. (2021a). Glycinebetaine promotes photosynthesis, biomass accumulation, and lipid production in *Nannochloropsis gaditana* under nitrogen deprivation. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(51), 17232-17241. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c05181>
- Zhang, Y., Xie, B., Chen, X., Zhang, J., & Yuan, S. (2021b). A key role of gut microbiota-vagus nerve/spleen axis in sleep deprivation-mediated aggravation of systemic inflammation after LPS administration. *Life sciences*, 265, 118736. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118736>

Material Suplementario

Tabla Suplementaria 1. Resumen de los datos de procesamiento y análisis de las muestras de piel y branquias.

Código	Tejido	Tratamiento	Lecturas de entrada	Lecturas tras el filtrado	Amplicones reconstruidos	Eliminación de quimeras
S_C1	piel	Control	206 314	206 201	162 180	91 011
S_C2	piel	Control	200 596	200 486	170 613	107 899
S_C3	piel	Control	262 388	262 239	219 364	128 265
S_C4	piel	Control	228 905	228 763	190 817	106 282
S_C5	piel	Control	197 450	197 341	164 414	99 870
S_C6	piel	Control	208 022	207 900	177 139	105 198
S_R1	piel	Cruda	226 860	226 725	183 810	109 814
S_R2	piel	Cruda	236 742	236 617	195 336	113 609
S_R3	piel	Cruda	182 440	182 332	146 320	85 066
S_R4	piel	Cruda	222 458	222 347	185 880	119 838
S_R5	piel	Cruda	194 069	193 974	132 666	99 503
S_R6	piel	Cruda	223 320	223 173	180 978	98 997
S_H1	piel	Hidrolizada	237 790	237 669	198 481	120 386
S_H2	piel	Hidrolizada	215 675	215 529	180 791	110 261
S_H3	piel	Hidrolizada	210 375	210 244	169 380	103 092
S_H4	piel	Hidrolizada	252 084	251 936	202 355	112 232
S_H5	piel	Hidrolizada	195 724	195 619	162 785	96 495
S_H6	piel	Hidrolizada	250 931	250 749	210 817	123 553
G_C1	branquia	Control	224 385	224 246	184 479	132 616
G_C2	branquia	Control	201 267	201 115	161 729	112 332
G_C3	branquia	Control	198 252	198 097	154 993	101 470
G_C4	branquia	Control	204 165	204 025	168 289	136 377
G_C5	branquia	Control	210 093	209 955	172 208	121 489
G_C6	branquia	Control	191 248	191 098	119 077	69 900
G_R1	branquia	Cruda	209 427	209 280	154 356	109 314
G_R2	branquia	Cruda	211 952	211 816	145 462	100 894
G_R3	branquia	Cruda	214 325	214 172	154 673	104 892
G_R4	branquia	Cruda	222 599	222 461	171 477	123 619
G_R5	branquia	Cruda	193 876	193 736	159 744	133 393
G_R6	branquia	Cruda	216 919	216 750	160 049	112 718
G_H1	branquia	Hidrolizada	191 302	191 162	143 628	98 043
G_H2	branquia	Hidrolizada	243 828	243 672	167 116	107 283
G_H3	branquia	Hidrolizada	213 644	213 494	171 485	128 081
G_H4	branquia	Hidrolizada	233 867	233 689	117 396	75 545
G_H5	branquia	Hidrolizada	208 975	208 837	170 339	134 896
G_H6	branquia	Hidrolizada	92 128	92 071	49 358	41 228

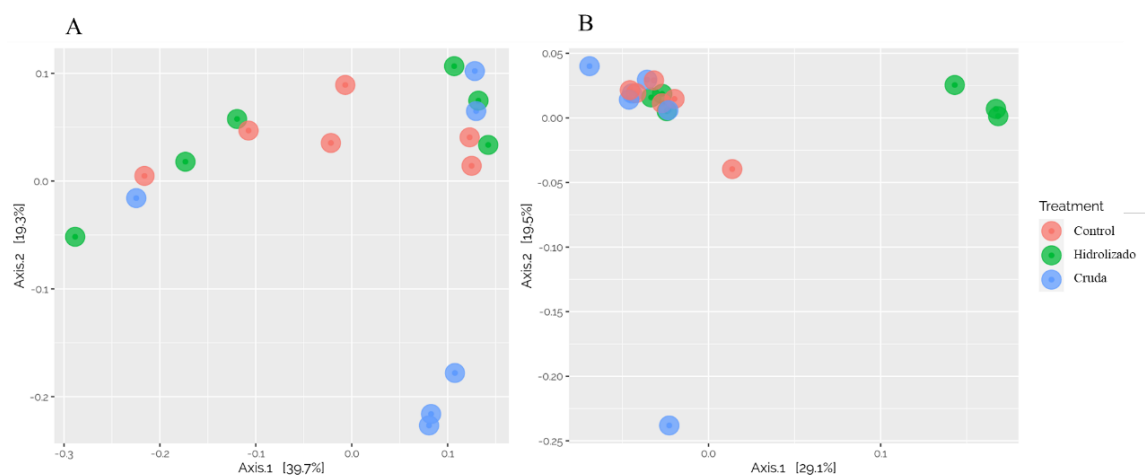


Figura Suplementaria 1. El análisis de coordenadas principales (PCoA) de las comunidades bacterianas se calculó a partir de la matriz de distancias ponderadas UniFrac en muestras de branquias (A) y piel (B). Los colores rojo, verde y azul representan muestras de la microbiota asociada a las mucosas de *S.aurata* alimentadas con dieta control, hidrolizada y cruda, respectivamente.

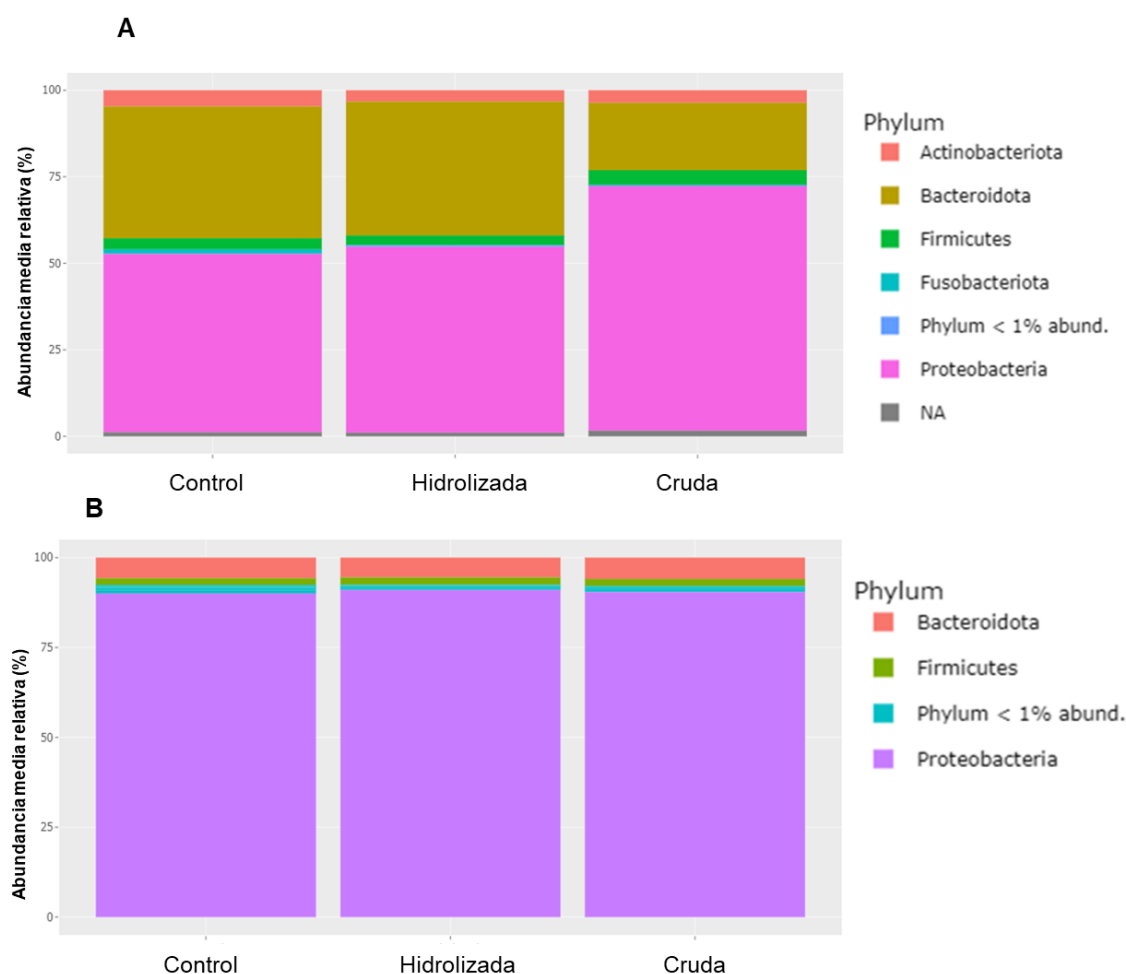


Figura Suplementaria 2. Abundancia relativa a nivel de filo en la microbiota (A) branquial y (B) cutánea de los peces. NA indica ASV que no estaban agrupados taxonómicamente a nivel de género dentro de la base de datos. ETC < 1% indica una abundancia relativa inferior al 1%.

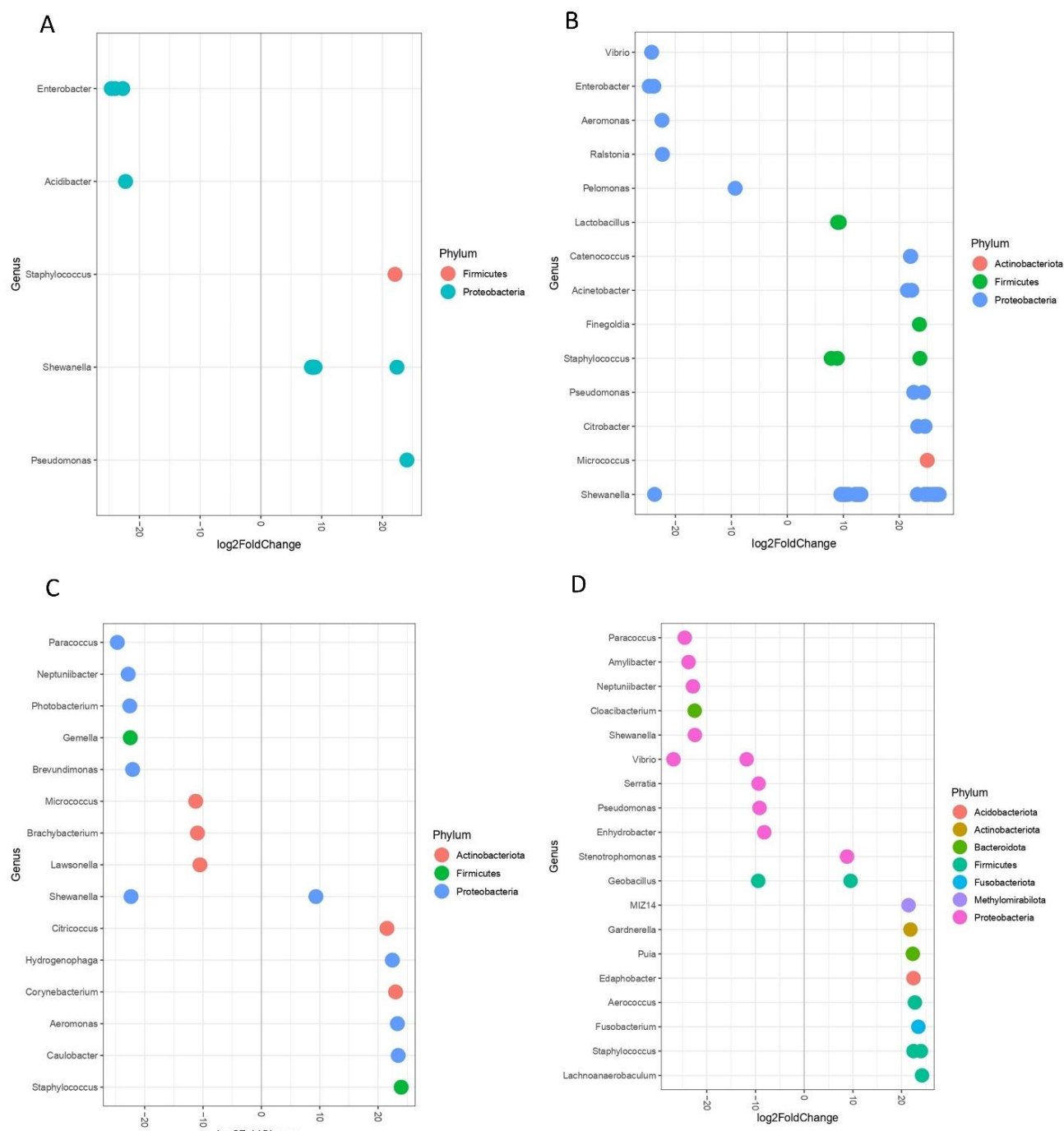


Figura Suplementaria 3. ASV significativamente diferentes (*DESeq2*, $p < 0,05$) clasificadas por género y filo en la microbiota mucosa de las branquias ((A) Hidrolizada frente a Control), (B) Cruda frente a Control) y la piel ((C) Hidrolizada frente a Control, (D) Cruda frente a Control).

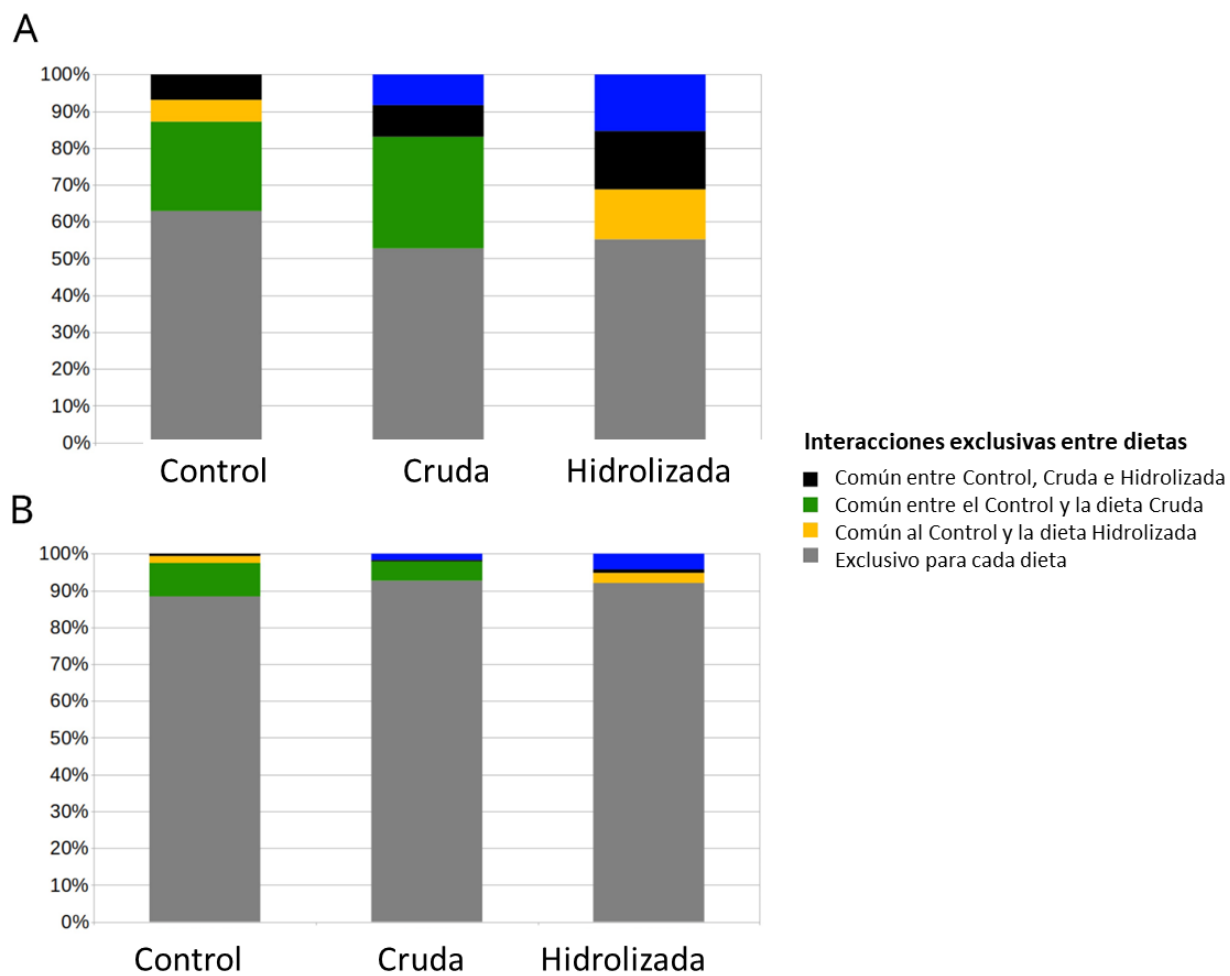


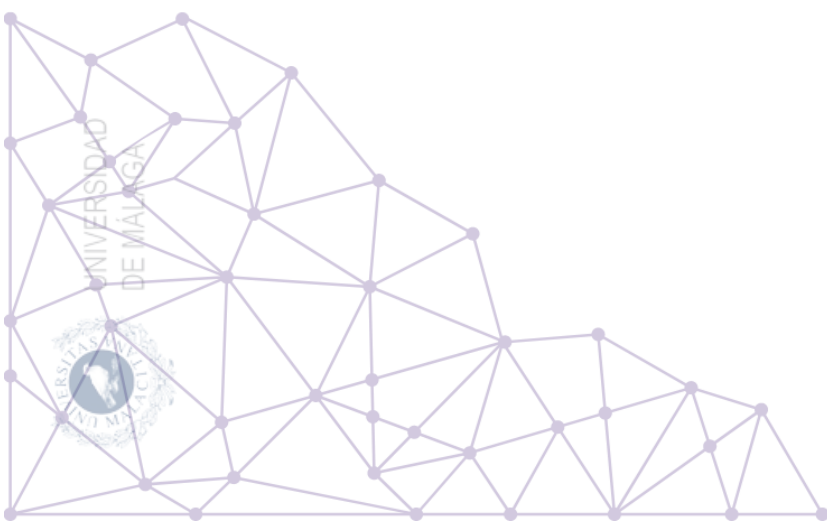
Figura Suplementaria 4. Interacciones exclusivas de la dieta en las branquias (A) y en la piel (B).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Capítulo 3





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Estudio del efecto sobre la microbiota y la respuesta transcriptómica de la piel dañada de *Sparus aurata* tras la administración de una dieta adicionada con el probiótico *Shewanella putrefaciens* SpPdp11

Resumen

Las lesiones cutáneas son un hecho frecuente asociado a condiciones de cultivo intensivo que afectan a los peces de cultivo. Sabiendo que el uso de probióticos puede mejorar la salud de la piel de los peces, la administración dietética de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11) ha demostrado efectos beneficiosos para los peces, por lo que es apropiado plantear el estudio de su potencial efecto en la piel. De esta forma, se provocaron heridas en la piel de ejemplares de *Sparus aurata*, en los que se analizó su microbiota y su respuesta transcriptómica. Aquellos ejemplares que recibieron la dieta con SpPdp11 mostraron una disminución en la abundancia de *Enterobacteriaceae*, *Photobacterium* y *Achromobacter*, grupos muy relacionados con microorganismos formadores de biopelículas. Igualmente, se observó en ellos la sobreexpresión de genes involucrados en mecanismos de señalización (*itpr3*), migración y diferenciación celular (*panxa*, *ttbk1a*, *smpd3*, *vamp5*); y la represión de genes relacionados con la proliferación celular (*vstm4a*, *areg*), lo que era compatible con procesos de curación de la piel más eficientes que los observados en el grupo que recibió la dieta control y que también habían inducido las heridas en la piel. Además, entre los diferentes grupos de peces con la piel dañada y que recibieron diferentes dietas, los géneros *Achromobacter*, *Fluviicola*, *Flavobacterium* y miembros de la familia *Ruminococcaceae* y filo *Bacteroidetes*, mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Además, estos grupos bacterianos mostraron correlaciones positivas con genes relacionados con la migración celular y correlaciones negativas con genes de inflamación y proliferación celular.

1. Introducción

El rápido desarrollo de la acuicultura debido a la gran demanda de pescado, ha llevado a una cría intensiva y a condiciones que tienen un impacto significativo en la salud de los peces (Karlsen et al., 2017). En este contexto, las superficies mucosas de los peces juegan un papel clave, ya que en estas barreras es donde tiene lugar las interacciones entre el organismo y el medio acuático. La epidermis de los peces está formada por varias capas de células vivas y participa en la homeostasis del organismo, siendo los queratinocitos los más abundantes. Entre ellos se encuentran otros tipos de células como las caliciformes, las sensoriales y las de alarma (Rakers y col., 2010). La parte externa (apical) de este epitelio está cubierta por una capa de moco (secretada principalmente por células caliciformes) y una poblada microbiota sobre ella (Guardiola y col., 2019). Además, el moco y el epitelio contienen muchos factores antimicrobianos, como proteasas, proteína C reactiva, anticuerpos, transferrina, lectinas, polipéptidos y antibióticos (Esteban y col., 2012; Ellis, 1999; Fast y col., 2002). La microbiota de la piel es un conjunto complejo y diverso de comunidades microbianas que interactúa estrechamente con el entorno circundante y tiene actividades fundamentales en el desarrollo y mantenimiento de la fisiología y la salud de los peces (Grice y Segre, 2011), defendiéndose contra patógenos (Balcázar y col., 2007; Peatman y col., 2015) e interaccionando con la respuesta inmunitaria (Hoseinifar y col., 2020; Kelly y Salinas, 2017). La microbiota cutánea es la más expuesta al entorno circulante y factores como la dieta y el estrés pueden inducir cambios en su composición (Gajardo y col., 2017; Sylvain y Derome, 2017) y en las secreciones mucosas de la piel (Landeira-Dabarca y col., 2013). Por lo tanto, la microbiota de la piel es más susceptible a alteraciones que la intestinal (Legrand y col., 2018; Wu y Wu, 2012). Comprender el microbioma de la piel proporcionaría una mejor comprensión de las interacciones entre el hospedador y los microorganismos, lo que tendría implicaciones importantes para las medidas profilácticas en acuicultura.

Los daños cutáneos son síntomas bastante comunes vinculados a la piscicultura intensiva, generalmente relacionados con una mayor predisposición del hospedador a padecer brotes de enfermedades (Lokesh y Kiron, 2016; Mohammed y Arias, 2015), desarrollar heridas y/o abrasiones en la piel, o la inflamación de las células epiteliales (Mateus y col., 2021). Los daños en la piel en los peces tienen un impacto en el valor económico de estas especies, debido a que se reduce su productividad y se modifica su apariencia, lo que hace que los

consumidores eviten comprar el producto. En las áreas afectadas de peces enfermos, la barrera mucosa se ve expuesta y se da una presencia significativa de posibles agentes patógenos. Cada vez, existe un mayor interés en la salud de la piel de los peces, ya que proporciona protección mecánica contra daños físicos, químicos y biológicos. En este sentido, el moco también juega un papel ecológico relevante en los bancos de peces, actuando como una señal de alarma y participando en diversas interacciones interespecíficas, como las relaciones presa-depredador, interacciones parásito-hospedador y simbiosis (Merrifield y Rodiles, 2015; Reverter y col., 2018). Por ello, es interesante llevar a cabo el análisis de la microbiota cutánea de los peces, con el propósito de identificar estrategias que mejoren la prevención y tratamiento de heridas en la piel, así como la búsqueda de posibles biomarcadores microbianos que indiquen la salud cutánea de los peces (Cámara-Ruiz y col., 2021).

Muchos enfoques científicos tienen como objetivo comprender los procesos que ocurren en el epitelio de la piel y cómo reforzar su integridad (Segner y col., 2012). Uno de estos enfoques es el uso de probióticos, que pueden mejorar la salud cutánea del animal (Chen y col., 2020; Hu y col., 2021). Se sabe que varios mecanismos probióticos ejercen efectos beneficiosos en los hospedadores a nivel intestinal, pero aún se desconoce su papel en la piel (Simón y col., 2021; Wuertz y col., 2021). *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11) es una bacteria probiótica aislada de piel sana de *S. aurata* (Díaz-Rosales y col., 2006), cuya administración dietética tiene efectos beneficiosos en peces de piscifactoría, como *S. aurata* y *Solea senegalensis* (Domínguez-Maqueda y col., 2021). Los estudios han abordado el impacto de SpPdp11 en la microbiota intestinal de especies de interés en acuicultura (Cámara-Ruiz y col., 2020), observando la capacidad del probiótico SpPdp11 para reducir la presencia de especies descritas como patógenos potenciales (Tapia-Paniagua y col., 2010; 2014). Sin embargo, aún no se ha estudiado el posible efecto que su administración a través del alimento pueda ejercer sobre la microbiota cutánea. Algunos resultados descritos por Chen y col. (2020), informaron del efecto que la administración dietética de SpPdp11 tiene en la transcripción de algunos genes relacionados con la regulación del sistema inmunitario y la reparación de tejidos en la piel herida de *S. aurata*. Sin embargo, no se analizaron los posibles cambios inducidos por esta dieta probiótica en la microbiota de la piel herida o su efecto sobre la respuesta transcriptómica general de la piel del hospedador.

La secuenciación de transcritos de ARN (RNA-seq) de piel sana y dañada mecánicamente y su microbiota asociada, se realizó utilizando tecnologías NGS, proporcionando nuevos conocimientos sobre el efecto de la administración de probióticos y los posibles procesos involucrados en la reparación de la piel en sus hospedadores a partir de estos mismos peces.

Por todo ello, el objetivo de este estudio es observar el efecto de una dieta suplementada con el probiótico SpPdp11 sobre la microbiota asociada al moco de la piel y la respuesta transcriptómica en muestras de piel de ejemplares de *S. aurata* dañadas mecánicamente.

2. Material y métodos

2.1. Crecimiento bacteriano

La cepa SpPdp11 se cultivó en caldo de triptona de soja (OXOID Ltd., Basingstoke, Reino Unido) suplementado con NaCl al 1,5% (TSBs, 20 h, 20 °C) en agitación continua. La densidad de la suspensión bacteriana se midió utilizando el contador de partículas Coulter Z2 (BECKMAN Coulter, Barcelona, España) y el volumen se ajustó con solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS, pH 7,4) a la concentración objetivo (10^9 UFC/g). Esta dosis se eligió en función de los beneficios para la salud de *S. aurata* y *S. senegalensis*, como se informó en estudios anteriores (Cámara-Ruiz y col., 2020; Díaz-Rosales y col., 2006).

2.2. Animales, diseño experimental y muestreo

Un total de 48 especímenes ($21,8 \pm 0,9$ g de masa corporal media) de dorada (*S. aurata* L. 1758), obtenidos de una granja local de Murcia (España) y mantenidos en cuarentena durante cuatro semanas, fueron alimentados con una dieta comercial de pellets (Skretting, Noruega) con una tasa del 2% de la biomasa del pez por día. Posteriormente, los peces fueron repartidos aleatoriamente en cuatro acuarios de agua de mar, en las Instalaciones de Peces Marinos de la Universidad de Murcia (250 L, aireación continua y caudal de 900 L/h), donde se llevó a cabo el ensayo de alimentación por parte de técnicos especializados. Los animales fueron alimentados dos veces al día (7 am y 7 pm), dos de los tanques fueron alimentados con la dieta control (grupo C), y los otros dos con la dieta control más la dosis probiótica indicada anteriormente (grupo P). Los peces se mantuvieron con un fotoperiodo artificial de 12 h de luz/12 h de oscuridad y los parámetros del agua fueron del 28‰ de salinidad y 20 °C. El alimento basal fue

la dieta comercial, que se complementó con volúmenes iguales de tampón salino de fosfato (PBS) o suspensión bacteriana (SpPdp11 al 10^9 UFC/g) para crear las dietas control y probiótica, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 1, después de 30 días de ensayo, se tomaron muestras de ocho peces de cada dieta (cuatro de cada acuario) (grupos C y P) tomando muestras de piel de la mitad del flanco izquierdo por encima de la línea lateral (con un troquel de biopsia de 8 mm de diámetro y una profundidad de 2 mm). Antes del muestreo, los peces fueron sacrificados con 100 ppm de aceite de clavo (Guinama®). Los peces restantes (ocho ejemplares de cada dieta, cuatro de cada acuario) fueron anestesiados (20 ppm de aceite de clavo) y se realizaron heridas similares de 8 mm de diámetro y 2 mm de profundidad en el medio del flanco izquierdo (debajo de la línea lateral) sobre la piel de todos ellos, con un troquel de biopsia circular (Integra™ Miltex™), cuidando de evitar cualquier posible contaminación con excreciones urogenitales y/o intestinales.

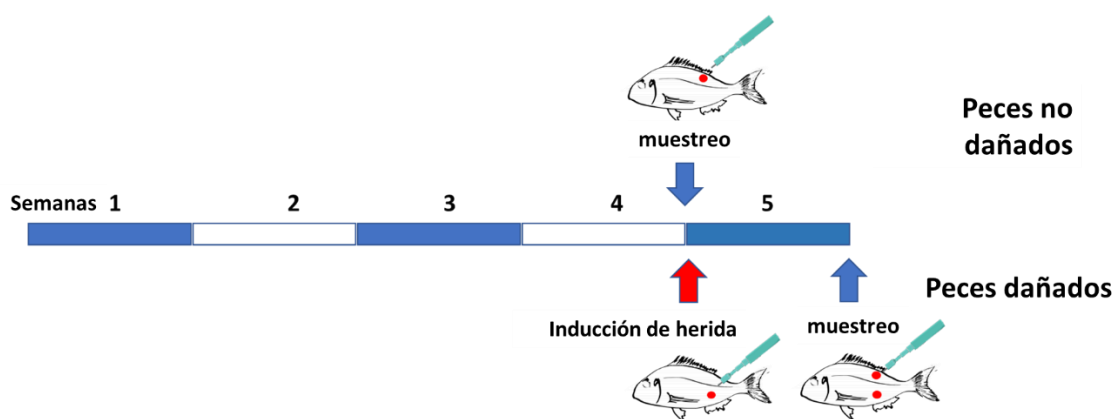


Figura 1. Diseño experimental. Las doradas fueron alimentadas durante 30 días con una dieta control o enriquecida con SpPdp11 10^9 UFC/g de dieta. A los 30 días del ensayo, después de la sedación, se tomaron muestras de 8 peces por dieta (no heridos) tomando muestras de piel de la mitad del flanco izquierdo por encima de la línea lateral (con un troquel de biopsia de 8 mm de diámetro y 2 mm de profundidad) obteniendo las muestras de los grupos C y P. Al resto de los peces del flanco izquierdo se les realizaron heridas similares con el mismo troquel de biopsia, pero por debajo de la línea lateral, y se mantuvieron alimentados durante una semana extra con la dieta asignada. Después de 7 días, se anestesiaron 8 peces por dieta y se tomaron muestras de piel en el mismo lugar descrito y con el mismo procedimiento descrito en los peces no heridos (grupos CW y PW).

Estos animales permanecieron en sus respectivos acuarios recibiendo su correspondiente dieta durante siete días más. Los peces fueron alimentados con la dieta inicialmente asignada, ajustándose la dosis diaria de acuerdo con el peso del pez. Siete días después de la herida, también se muestrearon ocho ejemplares de cada dieta (cuatro por acuario) (grupos CW y PW). Se obtuvieron muestras de

piel de la misma parte del cuerpo de los peces ilesos. Se seleccionaron aleatoriamente muestras de piel de cuatro peces por grupo experimental y cada muestra se dividió en dos para su posterior análisis de ARN y ADN, que se mantuvo a -80 °C hasta su uso.

2.3. Extracción de ADN y secuenciación del gen ADNr 16S de la microbiota asociada a la piel

Las muestras de piel (N = 4 por grupo), almacenadas a -80 °C, se descongelaron gradualmente en hielo. El contenido del moco se extrajo presionando hacia los extremos con un objeto estéril y se utilizó una porción de 50 mg de cada muestra de moco para la extracción de ADN. El ADN se extrajo en todos los casos siguiendo el protocolo basado en precipitación salina por (Martínez y col., 1998), con modificaciones menores (Tapia-Paniagua y col., 2010). El ADN se cuantificó fluorométricamente con el kit de ensayo Qubit™ dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y mediante métodos espectrofotométricos y electroforéticos para estudiar el grado de pureza, calidad e integridad del ADN.

La secuenciación del ADNr 16S de las muestras de moco se llevó a cabo en la plataforma Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) mediante secuenciación por pares (2 × 250 pb) en el Servicio de Ultrasecuenciación de Novogene Europe (Cambridge, Reino Unido). La preparación de la biblioteca para la secuenciación metagenómica 16S siguió el protocolo correspondiente. La secuenciación se realizó utilizando los cebadores 341F y 806R (5' 'CCTAYGGGRBGCASCAG 3' y 5' GGACTACNNGGGTATCTAAT 3', respectivamente) (Klindworth y col., 2013; Thijs y col., 2017), diseñados para abarcar las regiones hipervariables V3-V4 del gen ADNr 16S. Todas las lecturas de Illumina fueron visualizadas con el programa FastQC (versión 0.11.4), con una puntuación de Q30 superior al 92%. El procesamiento adicional de datos, incluido el filtrado, el análisis y la visualización, se realizó con el flujo de trabajo para ADNr 16S basado en el programa MOTHUR (versión 1.39.5). Estas secuencias de cada muestra fueron procesadas con el objetivo de eliminar lecturas de baja calidad y cadenas de homopolímeros. La detección y eliminación de quimeras se llevaron a cabo mediante UCHIME (versión 4.2) (Edgar y col., 2011). Posteriormente, las secuencias no quiméricas restantes se alinearon y agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTU) frente a la base de datos Greengenes (versión 13.5), con un límite de identidad del 97 %. Se estableció un umbral de recuento total en 0,005 %. La abundancia de las OTU de la microbiota

cutánea se procesó mediante las librerías *phyloseq* (McMurdie y Holmes, 2013) y *vegan* (Oksanen, 2017) del programa estadístico R. Las lecturas fueron normalizadas utilizando curvas de rarefacción, se eliminaron los resultados únicos y, además, se calculó el índice de cobertura de Good. La diversidad alfa se estimó utilizando los índices Chao1 y Shannon y Simpson, para evaluar riqueza, diversidad y dominancia, respectivamente. Para los análisis estadísticos entre índices de diversidad, se realizó un ANOVA de dos vías ($p < 0,05$). La abundancia diferencial entre taxones se llevó a cabo utilizando el paquete R *DESeq2* con una tasa de falsos descubrimientos $FDR < 0,05$.

2.4. Aislamiento de ARN, control de calidad y secuenciación

Se realizó la extracción de ARN total a partir de muestras de piel de dorada mediante la metodología de TRIsure™ (Qiagen, Alemania) y se eluyó en agua libre de nucleasas. La concentración de ARN total se cuantificó utilizando un kit de ensayo Qubit™ (Thermo Scientific, EE. UU.) de rango amplio de ARN, obteniéndose una cantidad de $1\,742,09 \pm 628,12$ ng/μL. El ARN fue almacenado a -80 °C para su posterior análisis. Antes de la secuenciación del ARN, se evaluó su integridad utilizando el kit de ensayo RNA Nano 6000 del sistema Bioanalyzer 2 100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). Las librerías de secuenciación de ARN fueron realizadas por el Centro de Secuenciación de la empresa Novogene (Cambridge, Reino Unido). Las librerías de ARN total se elaboraron con el kit de preparación de librerías de ARN Ultra™ para Illumina® (NEB, Ipswich, MA, EE. UU.) utilizando 1 μg de ARN por muestra. Las 12 librerías preparadas, se secuenciaron utilizando el HiSeq 2500 Illumina (secuenciación por pares, 2×150 pb). Las lecturas brutas se procesaron eliminando adaptadores de secuenciación, regiones poli-N y lecturas de baja calidad mediante el programa CASSAVA. Además, se calcularon los porcentajes de calidad Q20, Q30 y GC de los datos depurados. Todos los análisis posteriores se llevaron a cabo utilizando las lecturas procesadas y de alta calidad. Solo tres muestras por grupo cumplieron con los criterios de control de calidad de la secuenciación, lo que resultó en un $N = 12$ para el análisis de secuenciación de ARNm.

2.5. Análisis de expresión diferencial y enriquecimiento funcional

Las lecturas pareadas limpias, se mapearon frente al genoma de referenciade *S. aurata* fSpaAur1.1, actualizado el 30 de julio de 2019 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_900880675.1) utilizando el programa HISAT2 (Kim y col., 2019). Los recuentos de transcritos se obtuvieron a partir del programa HTSeq (Anders y col., 2015). El nivel de expresión de cada gen se normalizó al número de fragmentos por millón de kilobases (*Fragments Per Kilobase Million*, FPKM). Los estudios de expresión diferencial se llevaron a cabo utilizando el paquete de R *DESeq2* (Varet y col., 2016). Se consideraron genes diferencialmente expresados (*Differential Expressed Genes*, DEG) aquellos con una tasa de cambio en logaritmo ($|\log_2FC| \geq 1,3$ y un $FDR < 0,05$, en todas las condiciones del estudio. Los DEG de la comparación PW frente a CW se anotaron con genes ortólogos de Ensembl en *Danio rerio* (GRCz11) utilizando Full-Lengther NEXT (Córdoba-Caballero y col., 2020). Estos ortólogos se utilizaron para llevar a cabo el análisis de enriquecimiento funcional utilizando ExpHunter Suite (Jabato y col., 2021). Fueron considerados como categorías significativas aquellos términos de Gene Ontology (GO), rutas KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y Reactome con un valor de p ajustado $\leq 0,05$.

2.6. Correlación de microbiota y genes

Se eligieron al azar tres muestras de la zona anterior del intestino para estudiar la de microbiota y RNA-seq del mismo individuo. Se calculó la correlación entre la abundancia de las OTU y el nivel de expresión génica en la comparación entre PW y CW. Para llevar a cabo este análisis, las lecturas del gen marcador ribosomal 16S, previamente filtradas mediante curvas de rarefacción, y la matriz de niveles de expresión génica (FPKM) se normalizaron utilizando la mediana de *DESeq2*. Se calculó la correlación de rango de Spearman (Weiss y col., 2016) utilizando la función *rcorr* del paquete de R *Hmisc*. Se consideraron significativas las correlaciones gen-OTU con $p < 0,05$, seleccionándose únicamente aquellas con un valor de $|r| > 0,9$. Para visualizar estas correlaciones significativas, se empleó el programa Cytoscape (versión 3.8.2), centrándose en los 20 genes principales con una mayor tasa de cambio y OTU con una abundancia relativa superior al 0,05%.

2.7. Declaración del comité de ética

Todos los estudios relacionados con peces se realizaron siguiendo estrictamente las directrices de la Unión Europea (2010/63/UE) y española (RD 1201/2005 y RD 53/2013) para el uso de animales de laboratorio. El experimento *in vivo* se desarrolló en la Universidad de Murcia (España) y fue autorizado por su Comité Ético (código de protocolo A13150104). Los procedimientos también fueron aprobados por el Comité de Bioética y Bienestar Animal del Instituto de Investigación y Capacitación Agraria y Pesquera (IFAPA) y se les otorgó el número de registro 17/11/2016/171 según las autoridades nacionales de regulación del cuidado y experimentación animal.

2.8. Disponibilidad de los datos

Los archivos FASTQ sin procesar están disponibles dentro de los Bioproyectos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con los números de acceso PRJNA828434 y PRJNA862713.

3. Resultados

3.1. Análisis de la microbiota cutánea

Se analizaron cuatro réplicas por grupo. El secuenciador generó un total de 2 166 953 lecturas sin procesar. Estas lecturas fueron procesadas por herramientas bioinformáticas, generando un total de 111 408 lecturas válidas, siendo una media muestral de 87 843,44, que se agruparon en 1 332 OTU. La diversidad alfa se calculó a nivel de riqueza (Chao1), diversidad (Shannon) y dominancia (Simpson). No se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales (ANOVA de dos vías, $p > 0,05$) (Tabla 1, detalles estadísticos en Tabla suplementaria 1).

Tabla 1. Índices de diversidad alfa de la microbiota asociada a la mucosa cutánea de *S. aurata*. Peces alimentados con la dieta control sin (C) y con herida (CW) y peces alimentados con la dieta probiótica sin (P) y con herida (PW). El valor se representa por la media $\pm$ DE. No se observaron diferencias significativas (ANOVA; $p > 0,05$)

	Chao1	Shannon	Simpson
C	743,69 $\pm$ 56,03	4,48 $\pm$ 0,28	0,97 $\pm$ 0,01
P	685,44 $\pm$ 73,15	3,87 $\pm$ 1,02	0,88 $\pm$ 0,18
CW	717,13 $\pm$ 93,15	4,02 $\pm$ 0,61	0,93 $\pm$ 0,07
PW	689,67 $\pm$ 109,17	3,87 $\pm$ 0,27	0,95 $\pm$ 0,01

Las lecturas fueron filtradas mediante el uso de las curvas de rarefacción hasta alcanzar el valor mínimo de lecturas asintóticamente válidas (42 673 lecturas, 1 244 OTU) (Figura Suplementaria 1). La cobertura de la librería se determinó utilizando el índice de cobertura de Good, con un resultado del $99 \pm 0,02\%$ (promedio $\pm$ DE). Con el fin de evitar errores de clusterización, las muestras se filtraron para eliminar singleton y doubleton; en total, se analizaron 680 OTU. Las secuencias relacionadas con los filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* fueron las más abundantes, representando aproximadamente el 70% del total de secuencias analizadas en todos los casos (Figura 2 y Figura Suplementaria 2), mientras que *Actinobacteria*, *Acidimicrobia*, *Alfa-*, *Beta-* y *Gammaproteobacteria* fueron las clases más frecuentes en todos los ensayos experimentales (Figura 3 y Figura Suplementaria 3). En particular, el análisis comparativo a nivel de género (abundancia $> 0,5\%$) mostró un valor alto de géneros no identificados (Figura 4 y Figura Suplementaria 4).

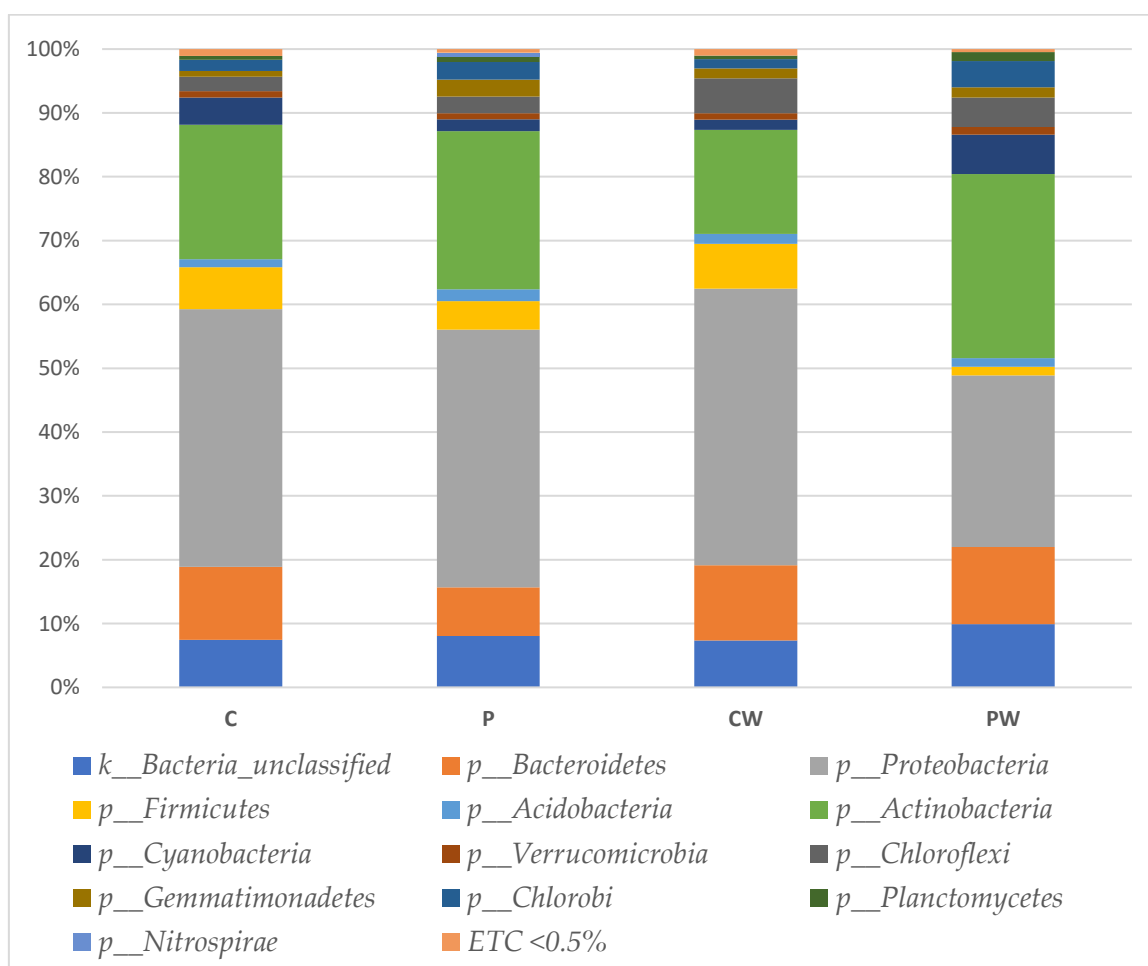


Figura 2. Abundancia relativa (%) de bacterias a nivel de filo en la microbiota de la mucosa de la piel de peces alimentados con una dieta de control sin (C) y con herida (CW); así como los peces alimentados con la dieta probiótica sin (P) y con herida (PW). ETC: abundancia relativa $<0,5\%$ en promedio.

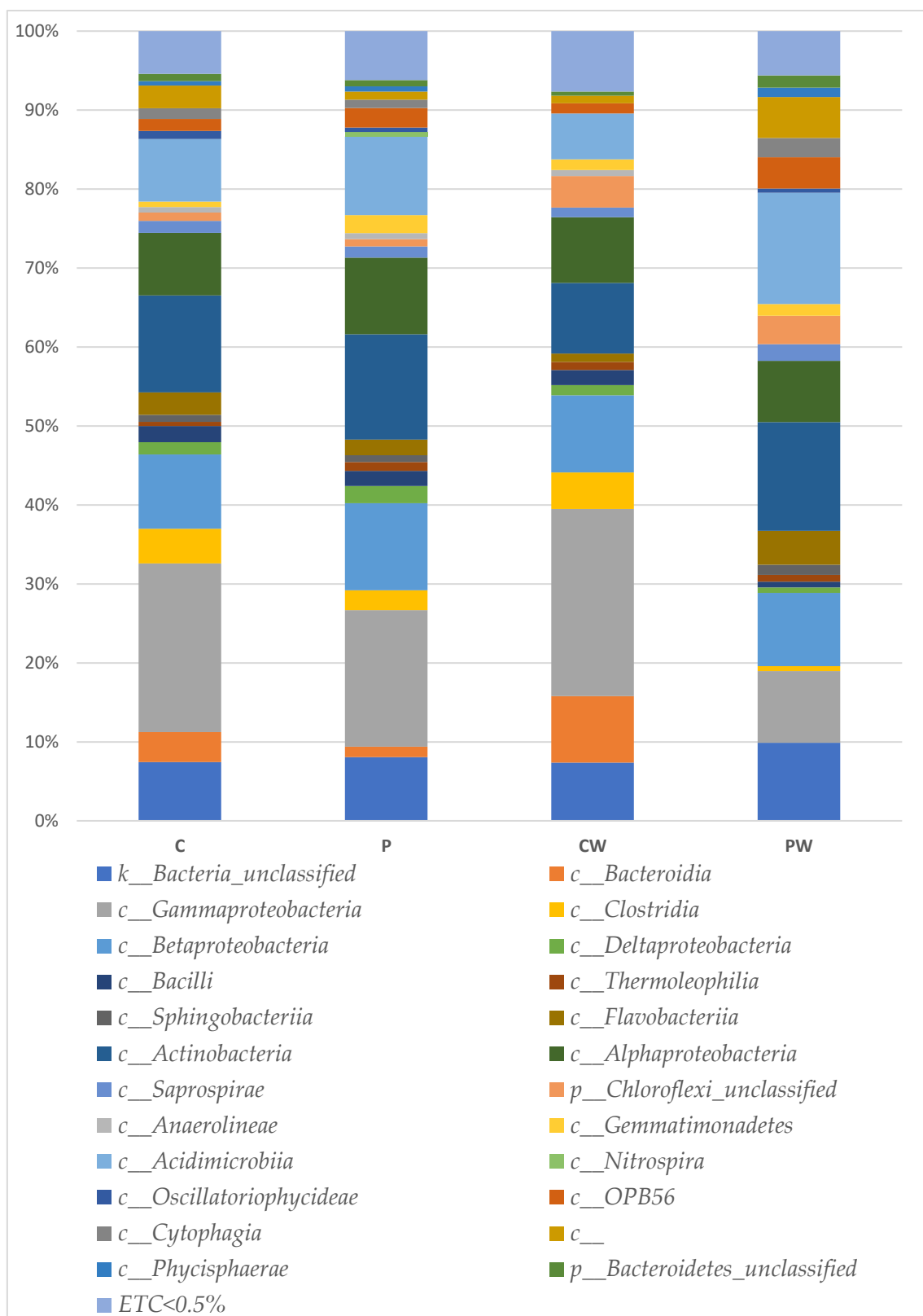


Figura 3. Abundancia relativa de bacterias a nivel de clase (%) en la microbiota de la mucosa de la piel de peces alimentados con una dieta de control sin (C) y con herida (CW); así como los peces alimentados con la dieta probiótica sin (P) y con herida (PW). ETC: Sumatorio de OTU con abundancia relativa < 0,5% en promedio; c__ representa los OTU no clasificados en esta categoría.

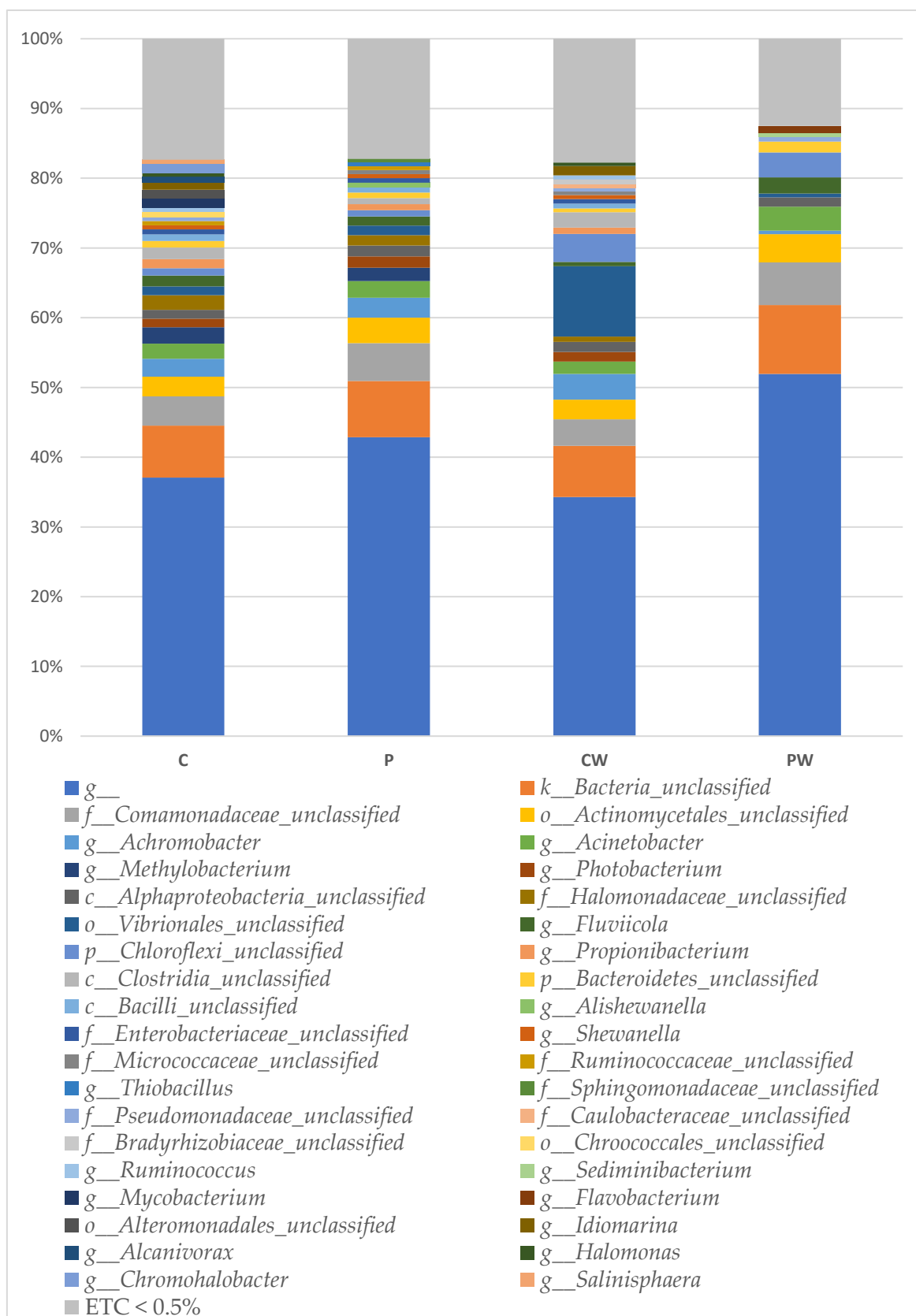


Figura 4. Abundancia relativa (%) de bacterias a nivel de género en la microbiota mucosa de la piel de peces alimentados con una dieta de control sin (C) y con herida (CW); así como los peces alimentados con la dieta probiótica sin (P) y con herida (PW). ETC: Sumatorio de OTU con abundancia relativa < 0,5% en promedio; g__ representa los OTU no clasificados en esta categoría.

No se detectaron diferencias significativas entre peces de los grupos C y P o C y CW (*DESeq2*, $p < 0,05$), mientras que sí se encontraron entre los grupos P y PW (Tabla Suplementaria 2) y, CW y PW (Figura 5). Se observaron diferencias significativas en las abundancias de OTU, como *c_Clostridia_unclassified*, *Ruminococcus*, *f_Ruminococcaceae*, *Propionibacterium*, *Idiomarina*, *Photobacterium*, *Achromobacter*, *f_Enterobacteriaceae*, *Fluviicola* y *p_Bacteroidetes_unclassified*, al comparar las microbiotas cutáneas de los peces de los grupos P y PW. Al estudiar la comparación entre CW y PW, los resultados también mostraron una abundancia significativamente menor de OTU asociadas a filos como *Firmicutes* (*c_Clostridia_unclassified*, *Ruminococcus* y *f_Ruminococcaceae*), actinobacterias (*Propionibacterium*) y principalmente proteobacterias (*Salinisphaera*, *Alcanivorax*, *Idiomarina*, *Chromohalobacter*, *Photobacterium*, *Achromobacter* y *f_Enterobacteriaceae*). Por otro lado, los peces del grupo PW mostraron una abundancia significativamente mayor de OTU relacionadas con el filo *Bacteroidetes*, como *Sediminibacterium*, *Flavobacterium*, *Fluviicola* y *p_Bacteroidetes_unclassified*.

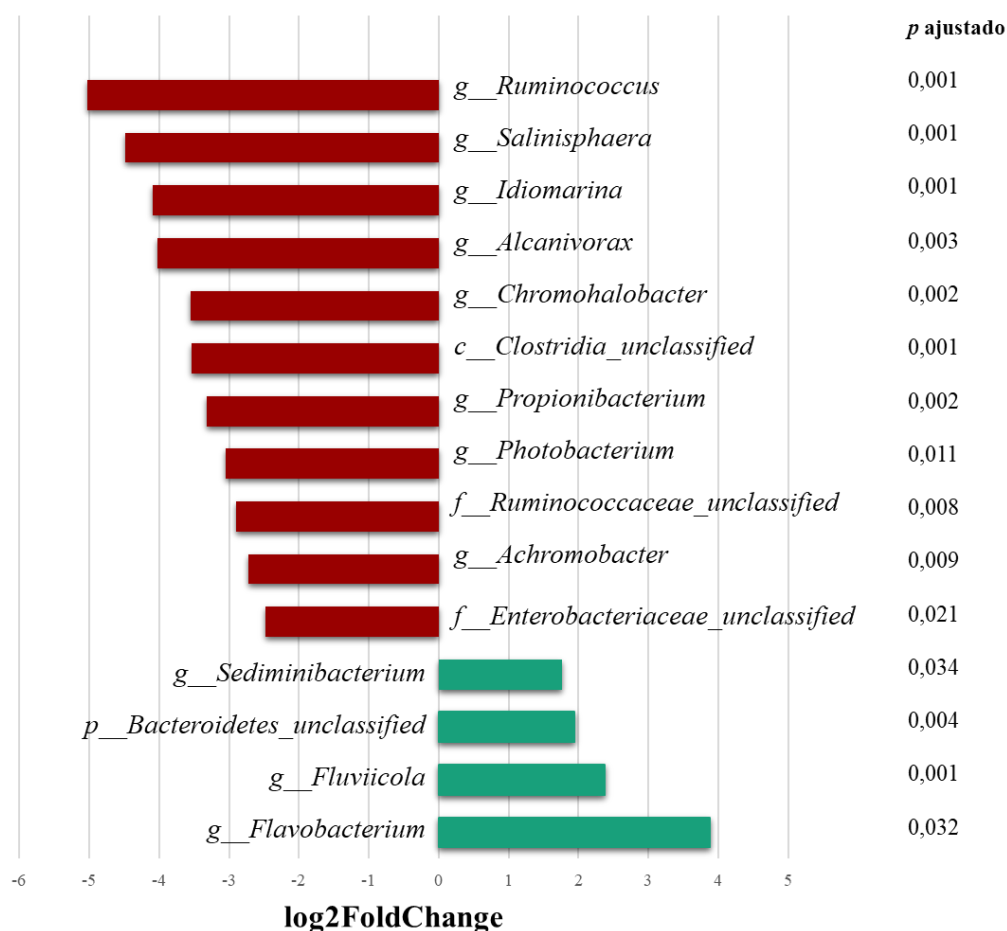


Figura 5. Diferencias significativas según *DESeq2* a nivel de género con abundancia relativa $> 0,5\%$ (*DESeq2*, $p < 0,05$) en la microbiota mucosa de la piel. Comparación entre los grupos de peces heridos que recibieron la dieta control (CW) y probiótico (PW).

3.2. Secuenciación del transcriptoma de la piel y análisis de genes expresados diferencialmente (DEG)

Se recuperó un total de 310 183 755 lecturas sin procesar con la secuenciación de Illumina de tres réplicas por grupo. El número final de lecturas por individuo osciló entre $50\,971\,570,50 \pm 5\,570\,365,99$ (medias $\pm$ DE), con un total de $81,67 \pm 23,28\%$ de lecturas mapeadas. El número de lecturas en cada grupo de tratamiento estuvo bien equilibrado con más de 40 millones en cada grupo (Tabla Suplementaria 3). FPKM cuyos valores superiores a 0,3 se tomaron como transcripciones válidas, eliminando las lecturas inferiores. Se expresaron más de 16 200 genes, de los cuales aproximadamente 400 genes excedieron el valor de 100 FPKM. El estudio de $FPKM > 0,3$ por muestra reveló una clara agrupación del perfil de expresión génica en el caso de las muestras del grupo CW (Figura 6A), mientras que se observó una agrupación entre la mayoría de las muestras de C y PW. Por otro lado, las muestras correspondientes al grupo P también estaban claramente agrupadas (Figura 6A).

Para identificar genes con expresión diferencial significativa (DEG), se comparó el perfil de secuencias de ARN obtenido de peces del grupo C con especímenes de los grupos P y CW. El análisis de los DEG reveló que la herida experimental en la piel del grupo control produjo la regulación negativa de 693 genes y la regulación positiva de 952 genes (*DESeq2*, ajuste de $p < 0,05$), mientras que la inclusión en la dieta de SpPdp11 (tratamiento P) provocó en la piel, la regulación hacia abajo o hacia arriba de 35 y 137 genes, respectivamente (*DESeq2*, p ajustado $< 0,05$, Figura suplementaria 5). También se enfrentaron grupos CW y PW, la comparación entre estos grupos reveló que 44 genes estaban sobreexpresados diferencialmente mientras que 72 estaban regulados negativamente (*DESeq2*, p ajustado $< 0,05$, Figura 6B).

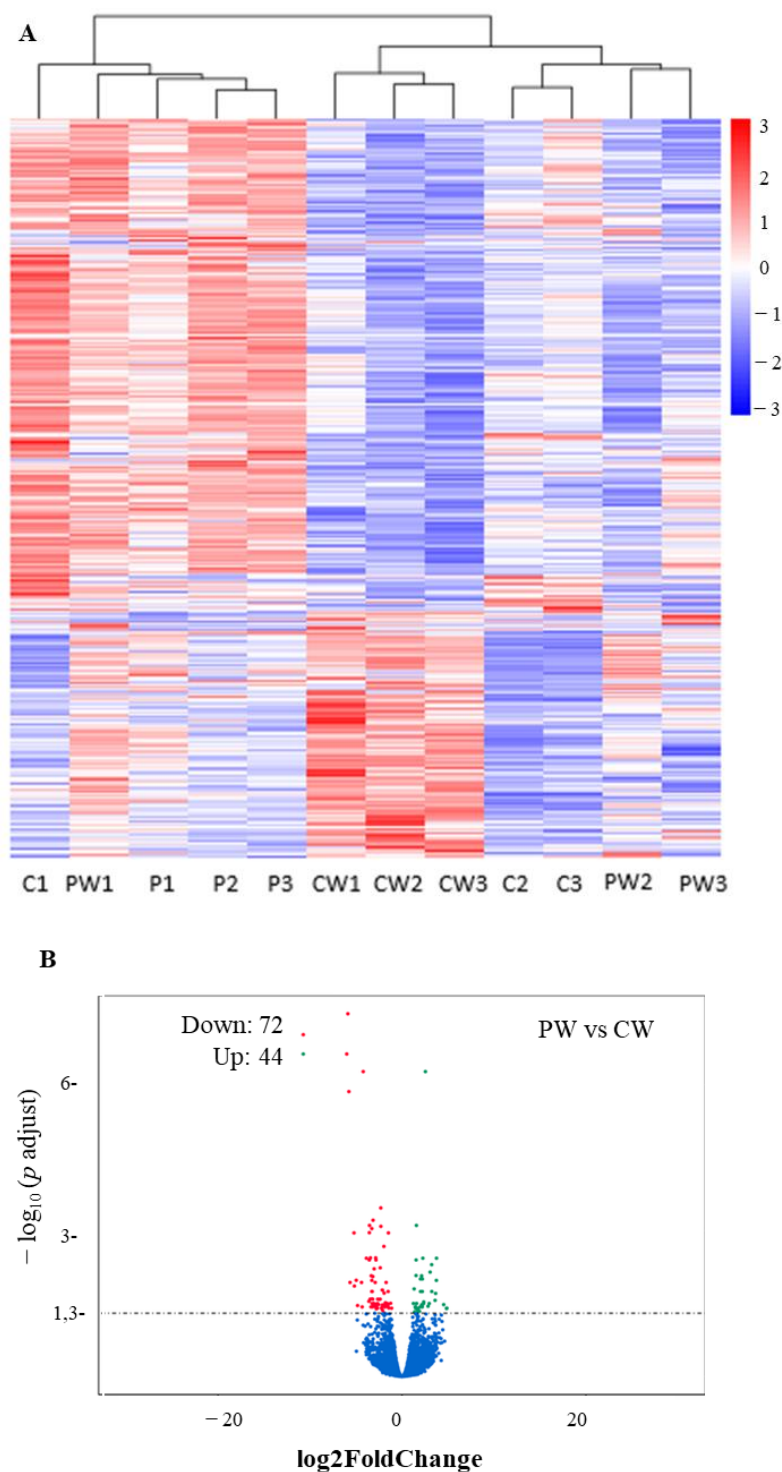


Figura 6. Análisis comparativo de la expresión génica. (A) Mapa de calor por muestra utilizando el valor log₁₀ (FPKM + 1). El rojo indica genes con altos niveles de expresión, mientras que el azul indica niveles bajos. La escala de colores de rojo a azul representa el valor log₁₀ (FPKM + 1) de mayor a menor. (B) Gráficos de volcán de genes expresados diferencialmente (DEG) entre comparación PW vs. CW, datos de expresión representados con el valor de corte FDR < 0,05 y cambio log₂ veces valor absoluto ≥ 1,3. Tratamientos estudiados: peces alimentados con la dieta control sin (C) y con herida (CW), peces alimentados con dieta probiótica sin (P) y con herida (PW). 1 a 3 representan réplicas biológicas.

3.3. Análisis de los DEG con los cambios de expresión más pronunciados

Las heridas no mostraron cambios significativos en la microbiota asociada a la piel de peces alimentados con dieta de control. El grupo que produjo cambios más significativos fue PW, con un perfil microbiano diferente al resto de grupos de estudio. Para comparar cómo actuó la dieta junto a las heridas, se utilizó la comparación CW y PW para el resto de los análisis. Se estudió la transcripción de los 10 genes principales regulados positivamente y los 10 principales regulados negativamente en muestras del grupo PW en comparación con el grupo CW, y los resultados se resumen en la Tabla 2. Se observó que en PW hubo una regulación positiva de genes involucrados en: (i) acilación y metilación de histonas y activación de genes, como *brd2a* y *kmt2cb*; (ii) codificar información para proteínas implicadas en la señalización celular (*adgrl1a*, *itpr3* y *adamtsl5*) y la migración celular (como *smpd3*, *vamp5*, *pxna* y *ttbk1a*); (iii) regulación del sistema inmunitario innato (como *nlrc3*). Por otro lado, se observa que en estos mismos peces se detectó la menor expresión de genes que codifican información para apoliproteínas (*apoa4b2*, *apoeb* y *apol*), enzimas implicadas en la inflamación y reparación de tejidos (*chia.1* y *chia.3*), proliferación celular (*areg*, *meltf* y *vstm4a*), regulación del moco (*gcnt3*) y proteínas implicadas en el anclaje en la matriz extracelular (*vwa2*) (Tabla 2).

3.4. Análisis de enriquecimiento del transcriptoma de *S. aurata* y de los genes expresados diferencialmente

Siguiendo el objetivo de este trabajo, los DEG entre los grupos dañados CW y PW se estudiaron en detalle utilizando el flujo de trabajo de DEgenes Hunter. El 83,01% de los transcritos encontrados en *S. aurata*, poseían un gen ortólogo de *D. rerio*, que se utilizaron para el posterior análisis de enriquecimiento funcional. Los 116 DEG obtenidos de la comparación entre peces de los grupos CW y PW se analizaron frente a las bases de datos GO, KEGG y Reactome. Se enriquecieron diferentes categorías de GO. Los genes relacionados con las actividades de los canales de calcio y las proteínas motoras, como la miosina, estaban sobreexpresados, aunque solo la función de “matriz extracelular” fue significativa en la categoría “Función molecular” (p ajustado $< 0,05$, Figura 7). La función “unión al sustrato celular” fue significativamente enriquecida en la categoría “Procesos biológicos” (p ajustado $< 0,05$, Figura suplementaria 6A). Además, en la categoría “Componentes celulares” la transcripción de genes

relacionados con la matriz extracelular que contiene colágeno y la fibra del citoesqueleto polimérico se encontraron reprimidos (p ajustado $< 0,05$, Figura suplementaria 6B). Con respecto a las categorías KEGG, el análisis funcional enriquecido no mostró categorías significativas (p ajustado $> 0,05$) (Figura suplementaria 7), mientras que en el análisis de Reactome los genes relacionados con “las proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP)” tuvieron un valor de p significativo (p ajustado $> 0,05$) (Figura suplementaria 8).

Tabla 2. Listado de los 20 genes significativamente más sobreexpresados (gris claro) y reprimidos (gris oscuro) en PW en comparación con CW.

	<i>S. aurata</i> IDs	<i>D. rerio</i> ensembl IDs	Log ₂ FC	Symbol Gene	Description
Supresión inmune	LOC115567352	ENSDARG000000105739	4,535	LOC101883187	Como NLRC3, regulador negativo de la respuesta inmunitaria innata
	LOC115579326	ENSDARG000000022280	4,847	<i>brd2a</i>	Contenido de bromodominio 2a
Replicación	LOC115569844	ENSDARG000000075560	2,548	<i>kmt2cb</i>	Específico de lisina (K) metiltransferasa 2Cb
	LOC115575230	ENSDARG000000089292	2,361	<i>adgrl1a</i>	Receptor L1a acoplado a proteína G de adhesión
Señal celular	adamtsl5	ENSDARG000000052118	3,74	<i>adamtsl5</i>	ADAMTS 5
	itpr3	ENSDARG000000061741	3,227	<i>itpr3</i>	Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato, tipo 3
	smpd3	ENSDARG000000098226	3,658	<i>smpd3</i>	Esfingomielina fosfodiesterasa 3
Migración celular	LOC115582399	ENSDARG000000068262	3,237	<i>vamp5</i>	Proteína 5 de membrana asociada a vesículas
	LOC115581334	ENSDARG000000109620	3,061	<i>pxna</i>	Paxillina a
	ttbk1	ENSDARG000000056019	2,96	<i>ttbk1a</i>	Tau tubulina quinasa 1a
Apolipoproteína	LOC115578371	ENSDARG000000020866	-6,008	<i>apoa4b.2</i>	Apolipoproteína A-IV b, duplicado en tándem 2
	LOC115579335	ENSDARG000000040295	-5,883	<i>apoeb</i>	Apolipoproteína Eb
	LOC115574970	ENSDARG000000073718	-4,828	<i>apol</i>	Apolipoproteína L
Quinases	LOC115583589	ENSDARG000000009612	-5,773	<i>chia.3</i>	Quinasa, ácida.3
	LOC115583106	ENSDARG000000100635	-5,216	<i>chia.1</i>	Quinasa, ácida.1
	LOC115581553	ENSDARG000000076853	-4,973	<i>areg</i>	Anfirregulina
Proliferación celular	meltf	ENSDARG000000075159	-5,649	<i>meltf</i>	Melanotransferrina
	LOC115590067	ENSDARG000000010154	-4,216	<i>vstm4a</i>	Conjunto V y dominio transmembrana que contiene 4a
Biosíntesis de mucina	gcnt3	ENSDARG000000060471	-4,399	<i>gcnt3</i>	Transferasa de Glucosaminilo (N-acetil) tipo 3, tipo mucina
Estructura celular	LOC115570587	ENSDARG000000075441	-4,33	<i>vwa2</i>	Dominio A del factor de Von Willebrand que contiene la proteína 2

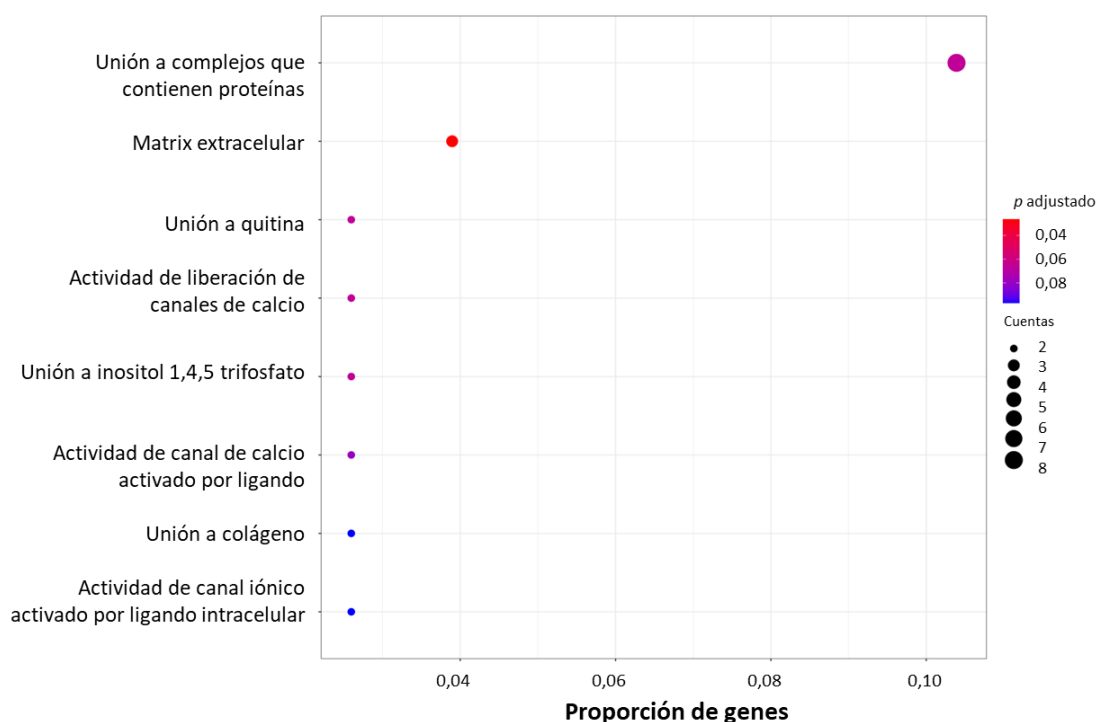


Figura 7. Diagrama de puntos de las categorías funcionales enriquecidas en la categoría “funciones moleculares” de GO a partir de los DEG de la comparación CW vs. PW. El grosor de los puntos indica el número de genes alterados, y se proporciona el valor de p ajustado y el Generatio (número de genes alterados dividido por el número total de genes en la ruta) para cada categoría.

3.5. Correlación entre la microbiota asociada al moco y los genes con mayor alteración en la piel de ejemplares de *S. aurata* con heridas

Se identificaron 733 correlaciones significativas (Spearman, $p < 0,05$ y $|r| < 0,9$, Tabla suplementaria 4) entre los 116 DEG encontrados en la comparación PW vs. CW y los 680 géneros clasificados. Dada la magnitud de los datos, se optó por realizar un estudio detallado de las correlaciones con los OTU que estaban presentes en los 20 DEG (tabla 2) que mostraron mayores tasas de cambio para la comparación PW frente al grupo CW. En la Figura 8, se representan las 11 OTU y 11 DEG que contribuyeron a las 24 correlaciones significativas identificadas (11 positivas y 13 negativas). Los genes *ttbk1y* *like-nlrc3* fueron los que mostraron mayor número de correlaciones entre estos OTU, concretamente 5 en el caso de *ttbk1* (todas negativas), y 4 (3 negativas y 1 positiva) en el de *like-nlrc3*. 5 de esos 11 OTU (*Achromobacter*, *f_Ruminococcaceae*, *p_Bacteroidetes*, *Fluviicola* y *Flavobacterium*) fueron también significativamente diferentes entre los individuos de los grupos PW y CW. *Achromobacter* y *f_Ruminococcaceae* mostraron abundancias estadísticamente menores en los especímenes PW, mientras que las



diversidad de la microbiota asociada con la piel del pez por una infección microbiana (Cámara-Ruiz y col., 2021; Karlsen y col., 2017). Es posible que la realización de una herida mecánica no implique cambios en la diversidad microbiana de manera indirecta, eso sí ocurre cuando las úlceras son producidas por agentes biológicos y sus interacciones con la microbiota.

La composición taxonómica a nivel de filo fue muy similar en todos los tratamientos aplicados, siendo *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* los filos más abundantes. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados para analizar la microbiota cutánea de *S. aurata* incluso en aquellas muestras con piel dañada artificialmente (Tapia-Paniagua y col., 2018).

La administración dietética de SpPdp11, no produjo cambios significativos en la composición de la microbiota asociada al moco de la piel de las muestras de dorada. Por el contrario, cuando se indujeron heridas a peces que recibían la dieta probiótica (PW), se observó una modulación significativa de su microbiota cutánea en comparación con los especímenes de los grupos P y CW. PW mostró una disminución en la abundancia de OTU, como la clase *Clostridia*, las familias *Ruminococcaceae* y *Enterobacteriaceae_unclassified*, y los géneros *Idiomarina*, *Photobacterium*, *Achromobacter* y *Ruminococcus*. Algunos de los géneros mencionados son anaerobios facultativos y, especialmente en seres humanos, se ha informado que estos microorganismos están notablemente asociados con las heridas, considerándose su presencia en el microbioma de la herida un pronóstico pesimista con respecto a su curación (Verbanic y col., 2020). Por otro lado, los peces PW mostraron disminuciones significativas de *Propionibacterium*. Este género es conocido por su capacidad de producir ácido propiónico (Tax y col., 2016), que se asocia con un retraso en la sanación de heridas (de Carvalho y col., 2015; Tomic-Canic y col., 2020). Además, la presencia de taxones relacionados con *Enterobacteriaceae* (Ramos-Vivas y col., 2019), *Photobacterium* (Khouadja y col., 2014; Remuzgo-Martínez y col., 2014) y *Achromobacter* (Cameron y col., 2019) está relacionada con la formación de biopelículas bacterianas. En estudios anteriores, se ha visto que las biopelículas bacterianas afectan a la cicatrización mediante la inhibición de la proliferación y migración de células epiteliales (Gajula y col., 2020). Este hecho no ha sido estudiado en *S. aurata*, pero en el futuro, algunos estudios se podrían centrar en corroborar la relación entre la presencia de estos taxones y la proliferación de células epiteliales. Esta disminución en *Enterobacteriaceae* podría deberse al alto nivel de proteasas en *S. aurata* herida, después de ser alimentada con una dieta

suplementada con SpPdp11, como se describió anteriormente (Chen y col., 2020). Los autores discutieron que las proteasas podrían afectar a las bacterias involucradas en la producción de daños en la piel, escindiendo sus proteínas, interfiriendo en su capacidad adhesiva y afectando su supervivencia (Guardiola y col., 2019).

La reparación de heridas es un fenómeno biológico complejo que depende de la síntesis de proteínas, la disposición de la matriz, la migración celular y la replicación (Eming y col., 2014). Estos procesos están guiados por señales de moléculas de la matriz extracelular y factores de crecimiento peptídicos. En este contexto, la comparación entre PW y CW mostró una disminución de los DEG relacionados con la matriz de colágeno y el citoesqueleto en peces del grupo PW, que son esenciales en la reparación de heridas (Abreu-Blanco y col., 2012; Schultz y Wysocki, 2009; Xue y Jackson, 2015). Por el contrario, los especímenes de este grupo mostraron una regulación positiva de genes implicados en el metabolismo del calcio, como el *itpr3*, que codifica los receptores del inositol 1,4,5-trifosfato que media la liberación intracelular de calcio con un efecto relevante en la homeostasis normal de la piel (Caterina y col., 2016; Lansdown, 2002; Yuspa y col., 1988). Además, estos mismos peces del grupo PW mostraron una regulación positiva de genes como *panxa*, *ttbk1a*, *smpd3* y *vamp5*, involucrados en la migración celular (Sero y col., 2011; Than y col., 2017), en la localización de proteínas (López-Colomé y col., 2017) y en la regulación de la proliferación celular (Borodzicz y col., 2016). De igual forma, *adgrl1a* y *adamtsl5*, genes implicados en la interacción y señalización celular, también estaban regulados positivamente en peces PW (Edwards y col., 2009; Zuko y col., 2016).

Por otro lado, los genes relacionados con el efecto epigenético, como la acetilación de histonas (*brd2a*) (Klein, 2018; Wang y col., 2021) y la metilación (*kmt2cb*) (Sen y col., 2008), también estaban regulados positivamente en muestras de PW. Estos genes podrían tener un efecto clave en la estratificación, proliferación y diferenciación epidérmica, al modular los queratinocitos durante el proceso de curación de la piel. Además, la proteína codificada por *brd2* actúa como un activador transcripcional mediante las marcas de acetilación en las histonas, gracias a las proteínas de bromo-dominio (BRD), las cuales presentan fuertes propiedades antiinflamatorias (Huang y col., 2007; Tang y col., 2010). Sin embargo, PW mostró una represión en DEG relacionados con apolipoproteínas (*apoeb*, *apoa4b.2* y *apol*) y quitinasas (*chia.3*, *chia.1*), involucrados en la respuesta inmunitaria y la cicatrización de heridas al interferir con la inflamación y la

reparación de tejidos (Gordts y col., 2014; N. Xu y col., 2019). Otros genes reprimidos como *meltrf*, *areg*, *gcnt3*, *vwa2* y *vstm4a* se han relacionado con la regeneración del tejido intestinal (Hernández-Pasos y col., 2017), la curación temprana (Bryant y col., 2017) y la proliferación celular (Berasain y col., 2005; Jung y col., 2015; Xu y col., 2010). Chen y col. (2020) mostró una importante represión de la transcripción de genes que codifican citoquinas proinflamatorias (*il-1 β* , *il-8*) y citoquinas antiinflamatorias (*tgf- β*) en la piel de especímenes heridos de *S. aurata* alimentados con una dieta suplementada con SpPdp11 de acuerdo con nuestro estudio, cuyas quitinasas han sido reprimidas en los peces del grupo PW.

Las correlaciones pueden ayudar a distinguir posibles relaciones entre taxones bacterianos y cambios la transcripción de genes del hospedador. Esto no implica causalidad, pero es un buen punto de partida y, en el futuro, se podría estudiar el efecto de la manipulación de taxones bacterianos específicos sobre la expresión de ciertos genes. En este contexto, cuando se estableció correlación entre los géneros microbianos y los 20 genes principales, se pudo determinar que 11 OTU estaban asociadas a correlaciones positivas o negativas con la expresión de estos genes, y 3 de ellas, *Achromobacter*, *Fluviicola*, *f__Ruminocaccae* y *p_Bacterioidetes*, mostraron diferencias significativas en sus abundancias cuando se comparó la microbiota del grupo PW con la microbiota de los grupos CW y P. Por otro lado, *tbbk1* y *nlrc3* fueron los genes con mayor número de interacciones. La transcripción de *nlrc3* que codifica una proteína que inhibe la activación del factor NF- κ β , desempeña un papel inhibitorio durante la inflamación (Schneider y col., 2013) bloqueando la proliferación celular (Zhang y col., 2014) y se correlacionó positivamente con el género *DA10* y negativamente con *Methylobacterium*, *f__Ruminocaccae* y *Paracoccus*. En relación con estos resultados, se ha descrito que *Paracoccus* se ha correlacionado positivamente con la transcripción sistémica de citoquinas proinflamatorias, como *Il-8* y *TNF α* , en muestras alimentadas con dietas que contienen nuevas fuentes de proteínas (Naya-Català y col., 2021). Estos resultados concuerdan con las bajas abundancias de este género detectadas en la microbiota cutánea de los peces del grupo PW en comparación con las detectadas en los del grupo CW. Las OTU relacionadas con *Methylobacterium*, *f__Ruminocaccae* y *Paracoccus*, además de *f__Halomonadaceae* y *Achromobacter*, con abundancias significativamente diferentes entre peces de los grupos CW y PW, se correlacionaron negativamente con la transcripción de *tbbk1*, involucrado en la migración celular (Breuzard y col., 2019). *Achromobacter*, como ya se ha comentado, es un género formador de biopelículas, lo cual es un factor

importante para inhibir la migración de las células epiteliales (Gajula y col., 2020). Además, produce metaloproteasas, como colagenasas (Breuzard y col., 2019; Tong y col., 1986) que también pueden inhibir la migración celular (Shanks y col., 2021). La reducción significativa en la abundancia de este género en la microbiota cutánea de los peces del grupo PW podría estar vinculada con una mayor transcripción del gen *ttbk1* en estos peces, pudiendo ser objeto de estudios futuros.

La presencia de *f__Sphingomonadaceae_unclassified* mostró una correlación positiva con *areg* y *apoa4b*, genes implicados en la curación temprana (Bryant y col., 2017). En otro estudio se comentó que *Sphingomonas* era uno de los géneros proinflamatorios, cuya abundancia se redujo en un modelo murino de cicatrización de heridas tratado con péptidos de colágeno aislados de piel de pescado (Mei y col., 2020).

Fluviicola (un género perteneciente a *Bacteroidetes*) y el filo *p__Bacteroidetes_unclassified*, con mayor abundancia en el grupo PW vs. CW, exhibieron una correlación negativa y positiva con *chia-1* y *vamp5*, respectivamente, mientras que *Achromobacter* mostró una correlación positiva con la transcripción de *chia-1*, *vstm4*, y *gcnt3*, gen implicado en la proliferación e inflamación celular y en la reparación de tejidos. Bousbaine y col. (2022) describieron una β -hexosaminidasa, una enzima conservada del filo *Bacteroidetes*, que en un modelo de colitis en ratón protegía contra la inflamación intestinal, y podría estar relacionado con la correlación negativa observada con respecto a la transcripción del gen *chia.1*. Por el contrario, las especies de *Achromobacter* se han asociado con la inducción de la inflamación (Hansen y col., 2010), que podría estar relacionado con la producción de biopelículas de este género (Zhao y col., 2013).

Flavobacterium mostró correlación positiva con la transcripción de *adamts15* e *itpr3*, genes que codifican proteínas implicadas en la señalización celular. Hay microorganismos que pueden estimular el flujo de calcio celular en respuesta a los mensajeros de ITRP3 a través de proteínas bacterianas formadoras de poros (PFP) (Tran van Nhieu y col., 2018). Se ha descrito que algunas especies de *Flavobacterium* son productoras de PFP (Dumetz y col., 2008) y el aumento de la abundancia de *Flavobacterium* en peces del grupo PW podría estar involucrado en esta estimulación del flujo de calcio en las células de la piel.

Naya-Català y col. (2021) describieron un efecto sistémico de la microbiota intestinal en especímenes de *S. aurata* alimentados con diferentes dietas

basándose en correlaciones de la transcriptómica del hígado y del riñón cefálico, con cambios en la microbiota intestinal. En este estudio se ha podido establecer que la inclusión dietética del probiótico SpPdp11 tuvo un efecto modulador sobre la microbiota y la respuesta transcriptómica de la piel herida de *S. aurata* y podría apoyar la existencia de un eje intestino-piel así como se ha descrito en mamíferos (Pessemier y col., 2021; Salem y col., 2018). Sin embargo, se necesita más investigación para demostrar esta sugerencia, como aumentar el número de réplicas en el estudio.

En resumen, el análisis de la microbiota asociada a la mucosa de la piel en especímenes de *S. aurata* heridos mecánicamente que recibieron la dieta control, reveló que la microbiota de estos peces no se vio afectada por la herida. Por el contrario, la dieta probiótica SpPdp11 mostró una modulación sobre los peces heridos (PW), especialmente por aumentos en la abundancia de OTU relacionados con *Bacteroidetes* y disminuciones en la abundancia de OTU relacionados con *Achromobacter*, *Paracoccus*, *Photobacterium*, *Propionibacterium*, *Idiomarina* y *Ruminococcus*, entre otros. Por otro lado, también se observaron diferencias en la transcriptómica cutánea de genes implicados especialmente en la migración celular, la proliferación celular y la inflamación entre los grupos CW y PW. Finalmente, varios géneros que mostraron diferencias significativas en su abundancia entre PW vs. CW, presentaron correlaciones positivas con genes relacionados con la migración celular y correlaciones negativas con la inflamación y la proliferación celular.

Referencias

- Abreu-Blanco, M. T., Verboon, J. M., Liu, R., Watts, J. J., & Parkhurst, S. M. (2012). *Drosophila* embryos close epithelial wounds using a combination of cellular protrusions and an actomyosin purse string. *Journal of Cell Science*, 125(24), 5984–5997. <https://doi.org/10.1242/jcs.109066>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Angeles Esteban, M., Editors, A., Bensussan, A., Flaño, E., Hayball, J. D., & Puccetti, P. (2012). An Overview of the immunological defenses in fish skin. *International Scholarly Research Network ISRN Immunology*, 2012, 29. <https://doi.org/10.5402/2012/853470>
- Balcázar, J. L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Gironés, O., & Múzquiz, J. L. (2007). In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. *Veterinary Microbiology*, 122(3–4), 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.01.023>
- Berasain, C., García-Trevijano, E. R., Castillo, J., Erroba, E., Lee, D. C., Prieto, J., & Avila, M. A. (2005). Amphiregulin: An early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology*, 128(2), 424–432. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.11.006>
- Borodicz, S., Rudnicka, L., Mirowska-Guzel, D., & Cudnoch-Jedrzejewska, A. (2016). The role of epidermal sphingolipids in dermatologic diseases. *Lipids in Health and Disease*, 15(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12944-016-0178-7>
- Bousbaine, D., Fisch, L. I., London, M., Bhagchandani, P., Rezende de Castro, T. B., Mimee, M., Olesen, S., Reis, B. S., VanInsberghe, D., Bortolatto, J., Poyet, M., Cheloha, R. W., Sidney, J., Ling, J., Gupta, A., Lu, T. K., Sette, A., Alm, E. J., Moon, J. J., & Bilate, A. M. (2022). A conserved *Bacteroidetes* antigen induces anti-inflammatory intestinal T lymphocytes. *Science*, 377(6606), 660–666. <https://doi.org/10.1126/science.abg5645>
- Breuzard, G., Pagano, A., Bastonero, S., Malesinski, S., Parat, F., Barbier, P., Peyrot, V., & Kovacic, H. (2019). Tau regulates the microtubule-dependent migration of glioblastoma cells via the Rho-ROCK signaling pathway. *Journal of Cell Science*, 132(3). <https://doi.org/10.1242/jcs.222851>
- Bryant, D. M., Sousounis, K., Payzin-Dogru, D., Bryant, S., Sandoval, A. G. W., Martinez Fernandez, J., Mariano, R., Oshiro, R., Wong, A. Y., Leigh, N. D., Johnson, K., & Whited, J. L. (2017). Identification of regenerative roadblocks via repeat deployment of limb regeneration in axolotls. *Npj Regenerative Medicine* 2(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41536-017-0034-z>
- Cámara-Ruiz, M., Balebona, M. C., Esteban, M. Á., & Moriño, M. Á. (2020). Probiotic *Shewanella putrefaciens* (SpPdp11) as a fish health modulator: A Review. *Microorganisms* 8(12), 1990. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121990>
- Cámara-Ruiz, M., Cerezo, I. M., Guardiola, F. A., García-Beltrán, J. M., Balebona, M. C., Moriño, M. Á., & Esteban, M. Á. (2021). Alteration of the immune response and the microbiota of the skin during a natural infection by *Vibrio harveyi* in european seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Microorganisms* 9(5), 964. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050964>
- Cameron, L. C., Bonis, B., Phan, C. Q., Kent, L. A., Lee, A. K., & Hunter, R. C. (2019). A putative enoyl-CoA hydratase contributes to biofilm formation and the antibiotic tolerance of *Achromobacter xylosoxidans*. *Npj Biofilms and Microbiomes* 5(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0093-6>



- Caterina, M. J., Pang, Z., Szallasi, A., & Huang, S. M. (2016). TRP Channels in skin biology and pathophysiology. *Pharmaceuticals* 9(4), 77. <https://doi.org/10.3390/PH9040077>
- Chen, Z., Ceballos-Francisco, D., Guardiola, F. A., & Esteban, M. Á. (2020). Dietary administration of the probiotic *Shewanella putrefaciens* to experimentally wounded gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) facilitates the skin wound healing. *Scientific Reports* 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68024-z>
- Córdoba-Caballero, J., Seoane, P., Jabato, F. M., Perkins, J. R., Manchado, M., & Claros, M. G. (2020). An improved de novo assembling and polishing of *Solea senegalensis* transcriptome shed light on retinoic acid signalling in larvae. *Scientific Reports* 10(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77201-z>
- de Carvalho, M. de F. P., Pereira, C. S. B., Fregnani, J. H., & Ribeiro, F. de A. Q. (2015). Comparative histological study on wound healing on rat's skin treated with Mitomycin C or Clobetasol propionate. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 30(9), 593–597. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020150090000002>
- Díaz-Rosales, P., Salinas, I., Rodríguez, A., Cuesta, A., Chabrilón, M., Balebona, M. C., Moriño, M. Á., Esteban, M. Á., & Meseguer, J. (2006). Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(4), 482–492. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2005.06.007>
- Domínguez-Maqueda, M., Cerezo, I. M., Tapia-Paniagua, S. T., De La Banda, I. G., Moreno-Ventas, X., Moriño, M. Á., & Balebona, M. C. (2021). A Tentative study of the effects of heat-inactivation of the probiotic strain *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on Senegalese Sole (*Solea senegalensis*) intestinal microbiota and immune response. *Microorganisms* 9(4), 808. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9040808>
- Dumetz, F., Duchaud, E., Claverol, S., Orioux, N., Papillon, S., Lapailierie, D., & Le Hénaff, M. (2008). Analysis of the *Flavobacterium psychrophilum* outer-membrane subproteome and identification of new antigenic targets for vaccine by immunomics. *Microbiology*, 154(6), 1793–1801. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.2008/016600-0>
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- Edwards, D. R., Handsley, M. M., & Pennington, C. J. (2009). The ADAM metalloproteinases. *Molecular Aspects of Medicine*, 29(5), 258–289. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.001>
- Ellis, A. E. (1999). Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 9(4), 291–308. <https://doi.org/10.1006/FSIM.1998.0192>
- Eming, S. A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*, 6(265). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>
- Fast, M. D., Sims, D. E., Burka, J. F., Mustafa, A., & Ross, N. W. (2002). 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*, 132(3), 645–657. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00109-5](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00109-5)

- Gajardo, K., Jaramillo-Torres, A., Kortner, T. M., Merrifield, D. L., Tinsley, J., Bakke, A. M., & Krogdahl, Å. (2017). Alternative protein sources in the diet modulate microbiota and functionality in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Applied and Environmental Microbiology*, 83(5). <https://doi.org/10.1128/AEM.02615-16>
- Gajula, B., Munnamgi, S., & Basu, S. (2020). How bacterial biofilms affect chronic wound healing: a narrative review. *International Journal of Surgery: Global Health*, 3(2), e16–e16. <https://doi.org/10.1097/gh9.000000000000016>
- Gordts, S. C., Muthuramu, I., Amin, R., Jacobs, F., & De Geest, B. (2014). The Impact of lipoproteins on wound healing: Topical HDL therapy corrects delayed wound healing in apolipoprotein E deficient mice. *Pharmaceuticals* 7(4), 419–432. <https://doi.org/10.3390/PH7040419>
- Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology* 2011 9:4, 9(4), 244–253. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>
- Guardiola, F. A., Mabrok, M., Machado, M., Azeredo, R., Afonso, A., Esteban, M. A., & Costas, B. (2019). Mucosal and systemic immune responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup) bath challenged with *Tenacibaculum maritimum*: A time-course study. *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 744–754. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2019.02.015>
- Hansen, C. R., Pressler, T., Nielsen, K. G., Jensen, P., Bjarnsholt, T., & Høiby, N. (2010). Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*, 9(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/J.JCF.2009.10.005>
- Hernández-Pasos, J., Valentín-Tirado, G., & García-Arrarás, J. E. (2017). Melanotransferrin: new homolog genes and their differential expression during intestinal regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 328(3), 259–274. <https://doi.org/10.1002/JEZ.B.22731>
- Hoseinifar, S. H., Shakouri, M., Yousefi, S., Van Doan, H., Shafiei, S., Yousefi, M., Mazandarani, M., Torfi Mozanzadeh, M., Tulino, M. G., & Faggio, C. (2020). Humoral and skin mucosal immune parameters, intestinal immune related genes expression and antioxidant defense in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed olive (*Olea europea* L.) waste. *Fish & Shellfish Immunology*, 100, 171–178. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2020.02.067>
- Hu, C., Liu, M., Tang, L., Liu, H., Sun, B., & Chen, L. (2021). Probiotic intervention mitigates the metabolic disturbances of perfluorobutanesulfonate along the gut-liver axis of zebrafish. *Chemosphere*, 284, 131374. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.131374>
- Huang, H., Zhang, J., Shen, W., Wang, X., Wu, J., Wu, J., & Shi, Y. (2007). Solution structure of the second bromodomain of Brd2 and its specific interaction with acetylated histone tails. *BMC Structural Biology*, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-57>
- Jabato, F. M., Córdoba-Caballero, J., Rojano, E., Romá-Mateo, C., Sanz, P., Pérez, B., Gallego, D., Seoane, P., Ranea, J. A. G., & Perkins, J. R. (2021). Gene expression analysis method integration and co-expression module detection applied to rare glucide metabolism disorders using ExpHunterSuite. *Scientific Reports* 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94343-w>
- Jung, K., Seo, S. K., & Choi, I. (2015). Endogenous VSIG4 negatively regulates the helper T cell-mediated antibody response. *Immunology Letters*, 165(2), 78–83. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2015.04.004>

- Karlsen, C., Ottem, K. F., Brevik, Ø. J., Davey, M., Sørum, H., & Winther-Larsen, H. C. (2017). The environmental and host-associated bacterial microbiota of Arctic seawater-farmed Atlantic salmon with ulcerative disorders. *Journal of Fish Diseases*, 40(11), 1645–1663. <https://doi.org/10.1111/JFD.12632>
- Kelly, C., & Salinas, I. (2017). Under pressure: Interactions between commensal microbiota and the teleost immune system. *Frontiers in Immunology*, 8(MAY), 559. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.00559>
- Khouadja, S., Lamari, F., Bakhrouf, A., & Gaddour, K. (2014). Virulence properties, biofilm formation and random amplified polymorphic DNA analysis of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolates from cultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Microbial Pathogenesis*, 69–70(1), 13–19. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2014.03.007>
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology* 37(8), 907–915. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
- Klein, K. (2018). Bromodomain protein inhibition: a novel therapeutic strategy in rheumatic diseases. *RMD Open*, 4(2), e000744. <https://doi.org/10.1136/RMDOPEN-2018-000744>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1–e1. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS808>
- Landeira-Dabarca, A., Sieiro, C., & Álvarez, M. (2013). Change in food ingestion induces rapid shifts in the diversity of microbiota associated with cutaneous mucus of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*, 82(3), 893–906. <https://doi.org/10.1111/JFB.12025>
- Lansdown, A. B. G. (2002). Calcium: A potential central regulator in wound healing in the skin. In *Wound Repair and Regeneration* 10(5), 271–285. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.2002.10502.x>
- Legrand, T. P. R. A., Catalano, S. R., Wos-Oxley, M. L., Stephens, F., Landos, M., Bansemer, M. S., Stone, D. A. J., Qin, J. G., & Oxley, A. P. A. (2018). The inner workings of the outer surface: Skin and gill microbiota as indicators of changing gut health in Yellowtail Kingfish. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN), 2664. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02664>
- Lokesh, J., & Kiron, V. (2016). Transition from freshwater to seawater reshapes the skin-associated microbiota of Atlantic salmon. *Scientific Reports*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep19707>
- López-Colomé, A. M., Lee-Rivera, I., Benavides-Hidalgo, R., & López, E. (2017). Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. *Journal of Hematology & Oncology* 2017 10:1, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S13045-017-0418-Y>
- Martínez, G., Shaw, E. M., Carrillo, M., & Zanuy, S. (1998). Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *BioTechniques*, 24(2), 238–239. <https://doi.org/10.2144/98242bm14>
- Mateus, A. P., Mourad, M., & Power, D. M. (2021). Skin damage caused by scale loss modifies the intestine of chronically stressed gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Developmental & Comparative Immunology*, 118, 103989. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2020.103989>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

- Mei, F., Liu, J., Wu, J., Duan, Z., Chen, M., Meng, K., Chen, S., Shen, X., Xia, G., & Zhao, M. (2020). Collagen peptides isolated from *Salmo salar* and *Tilapia nilotica* skin accelerate wound healing by altering cutaneous microbiome colonization via upregulated NOD2 and BD14. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(6), 1621–1633. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B08002>
- Merrifield, D. L., & Rodiles, A. (2015). The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. *Mucosal Health in Aquaculture*, 273–295. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00010-8>
- Mohammed, H. H., & Arias, C. R. (2015). Potassium permanganate elicits a shift of the external fish microbiome and increases host susceptibility to columnaris disease. *Veterinary Research*, 46(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S13567-015-0215-Y>
- Naya-Català, F., do Vale Pereira, G., Piazzon, M. C., Fernandes, A. M., Caldach-Giner, J. A., Sitjà-Bobadilla, A., Conceição, L. E. C., & Pérez-Sánchez, J. (2021). Cross-talk between intestinal microbiota and host gene expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles: insights in fish feeds for increased circularity and resource utilization. *Frontiers in Physiology*, 12(October), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.748265>
- Oksanen, J. (2017). Vegan: ecological diversity. *R Package Version 2.4-4*, 1, 11. <https://cran.r-project.org/package=vegan>
- Peatman, E., Lange, M., Zhao, H., & Beck, B. H. (2015). Physiology and immunology of mucosal barriers in catfish (*Ictalurus* sp.). <http://Dx.Doi.Org/10.1080/21688370.2015.1068907>, 3(4), 1–14. <https://doi.org/10.1080/21688370.2015.1068907>
- Pessemier, B. De, Grine, L., Debaere, M., Maes, A., Paetzold, B., & Callewaert, C. (2021). Gut–skin axis: Current knowledge of the interrelationship between microbial dysbiosis and skin conditions. *Microorganisms*, 9(2), 1–33. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020353>
- Rakers, S., Gebert, M., Uppalapati, S., Meyer, W., Maderson, P., Sell, A. F., Kruse, C., & Paus, R. (2010). ‘Fish matters’: the relevance of fish skin biology to investigative dermatology. *Experimental dermatology*, 19(4), 313–324. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.01059.x>
- Ramos-Vivas, J., Chapartegui-González, I., Fernández-Martínez, M., González-Rico, C., Fortún, J., Escudero, R., Marco, F., Linares, L., Montejo, M., Aranzamendi, M., Muñoz, P., Valerio, M., Aguado, J. M., Resino, E., Ahufinger, I. G., Vega, A. P., Martínez, L., Fariñas, M. C., Ruiz San Millán, J. C., & de la Torre Cisneros, J. (2019). Biofilm formation by multidrug resistant *Enterobacteriaceae* strains isolated from solid organ transplant recipients. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45060-y>
- Remuzgo-Martínez, S., Lázaro-Díez, M., Padilla, D., Vega, B., El Aamri, F., Icardo, J. M., Acosta, F., & Ramos-Vivas, J. (2014). New aspects in the biology of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: Pili, motility and adherence to solid surfaces. *Veterinary Microbiology*, 174(1–2), 247–254. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2014.08.005>
- Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P. (2018). Biological and ecological roles of external fish mucus: a review. *Fishes* 2018, Vol. 3, Page 41, 3(4), 41. <https://doi.org/10.3390/FISHES3040041>
- Salem, I., Ramser, A., Isham, N., & Ghannoum, M. A. (2018). The gut microbiome as a major regulator of the gut-skin axis. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01459>

- Schneider, M., Zimmermann, A. G., Roberts, R. A., Zhang, L., Karen, V., Rahman, A. H., Conti, B. J., Eitas, T. K., & Koller, B. H. (2013). The innate immune sensor NLRC3 attenuates Toll-like receptor signaling via modification of the signaling adaptor TRAF6 and transcription factor NF- κ B. *Nature immunology*, 13(9), 823–831. <https://doi.org/10.1038/ni.2378>
- Schultz, G. S., & Wysocki, A. (2009). Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 17(2), 153–162. <https://doi.org/10.1111/J.1524-475X.2009.00466.X>
- Segner, H., Sundh, H., Buchmann, K., Douxfils, J., Sundell, K. S., Mathieu, C., Ruane, N., Jutfelt, F., Toften, H., & Vaughan, L. (2012). Health of farmed fish: Its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), 85–105. <https://doi.org/10.1007/S10695-011-9517-9>
- Sen, G. L., Webster, D. E., Barragan, D. I., Chang, H. Y., & Khavari, P. A. (2008). Control of differentiation in a self-renewing mammalian tissue by the histone demethylase JMJD3. *Genes & Development*, 22(14), 1865–1870. <https://doi.org/10.1101/GAD.1673508>
- Sero, J. E., Thodeti, C. K., Mammoto, A., Bakal, C., Thomas, S., & Ingber, D. E. (2011). Paxillin mediates sensing of physical cues and regulates directional cell motility by controlling lamellipodia positioning. *PLOS ONE*, 6(12), e28303. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0028303>
- Shanks, R. M. Q., Higaylan, M. Al, Stella, N., Brothers, K. M., & Thibodeau, P. H. (2021). Bacterial metalloproteases inhibit epithelial cell migration and wound healing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 62(8), 416–416.
- Simón, R., Docando, F., Nuñez-Ortiz, N., Tafalla, C., & Díaz-Rosales, P. (2021). Mechanisms Used by Probiotics to Confer Pathogen Resistance to Teleost Fish. *Frontiers in Immunology*, 12, 1. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.653025>
- Sylvain, F. É., & Derome, N. (2017). Vertically and horizontally transmitted microbial symbionts shape the gut microbiota ontogenesis of a skin-mucus feeding discus fish progeny. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05662-w>
- Tang, L., Nogales, E., & Ciferri, C. (2010). Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 102(2–3), 122–128. <https://doi.org/10.1016/J.PBIOMOLBIO.2010.05.001>
- Tapia-Paniagua, S. T., Vidal, S., Lobo, C., Prieto-Álamo, M. J., Jurado, J., Cordero, H., Cerezuela, R., García de la Banda, I., Esteban, M. A., Balebona, M. C., & Moriñigo, M. A. (2014). The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 209–221. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2014.08.019>
- Tapia-Paniagua, Silvana Teresa, Ceballos-Francisco, D., Balebona, M. C., Esteban, M. Á., & Moriñigo, M. Á. (2018). Mucus glycosylation, immunity and bacterial microbiota associated to the skin of experimentally ulcerated gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & Shellfish Immunology*, 75, 381–390. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2018.02.006>
- Tapia-Paniagua, Silvana Teresa, Chabrillón, M., Díaz-Rosales, P., de la Banda, I. G., Lobo, C., Balebona, M. C., & Moriñigo, M. A. (2010). Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbial Ecology*, 60(2), 310–319. <https://doi.org/10.1007/S00248-010-9680-Z>

- Tax, G., Urbán, E., Palotás, Z., Puskás, R., Kónya, Z., Bíró, T., Kemény, L., & Szabó, K. (2016). Propionic acid produced by *Propionibacterium acnes* strains contributes to their pathogenicity. *Acta Dermato-Venereologica*, 96(1), 43–49. <https://doi.org/10.2340/00015555-2154>
- Than, U. T. T., Guanzon, D., Leavesley, D., & Parker, T. (2017). Association of extracellular membrane vesicles with cutaneous wound healing. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol. 18, Page 956, 18(5), 956. <https://doi.org/10.3390/IJMS18050956>
- Thijs, S., De Beeck, M. O., Beckers, B., Truyens, S., Stevens, V., Van Hamme, J. D., Weyens, N., & Vangronsveld, J. (2017). Comparative evaluation of four bacteria-specific primer pairs for 16S rRNA gene surveys. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 494. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00494>
- Tomic-Canic, M., Burgess, J. L., O'Neill, K. E., Strbo, N., & Pastar, I. (2020). Skin microbiota and its interplay with wound healing. *American Journal of Clinical Dermatology*, 21(1), 36–43. <https://doi.org/10.1007/S40257-020-00536-W/>
- Tong, N. T., Tsugita, A., & Keil-Dlouha, V. (1986). Purification and characterization of two high-molecular-mass forms of *Achromobacter collagenase*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 874(3), 296–304. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(86\)90028-2](https://doi.org/10.1016/0167-4838(86)90028-2)
- Tran Van Nhieu, G., Dupont, G., & Combettes, L. (2018). Ca²⁺ signals triggered by bacterial pathogens and microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1865(11), 1838–1845. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2018.08.007>
- Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J. Y., & Dillies, M. A. (2016). SARTools: A DESeq2- and EdgeR-based R pipeline for comprehensive differential analysis of RNA-Seq Data. *PLOS ONE*, 11(6), e0157022. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0157022>
- Verbanic, S., Shen, Y., Lee, J., Deacon, J. M., & Chen, I. A. (2020). Microbial predictors of healing and short-term effect of debridement on the microbiome of chronic wounds. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0130-5>
- Wang, N., Wu, R., Tang, D., & Kang, R. (2021). The BET family in immunity and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 1–22. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00384-4>
- Weiss, S., Van Treuren, W., Lozupone, C., Faust, K., Friedman, J., Deng, Y., Xia, L. C., Xu, Z. Z., Ursell, L., Alm, E. J., Birmingham, A., Cram, J. A., Fuhrman, J. A., Raes, J., Sun, F., Zhou, J., & Knight, R. (2016). Correlation detection strategies in microbial data sets vary widely in sensitivity and precision. *The ISME Journal* 2016 10:7, 10(7), 1669–1681. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.235>
- Wu, H. J., & Wu, E. (2012). The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut microbes* 3(1). <https://doi.org/10.4161/GMIC.19320>
- Wuertz, S., Schroeder, A., & Wanka, K. M. (2021). Probiotics in Fish Nutrition—Long-Standing Household Remedy or Native Nutraceuticals? *Water* 2021, Vol. 13, Page 1348, 13(10), 1348. <https://doi.org/10.3390/W13101348>
- Xu, N., Bo, Q., Shao, R., Liang, J., Zhai, Y., Yang, S., Wang, F., & Sun, X. (2019). Chitinase-3-like-1 promotes m2 macrophage differentiation and induces choroidal neovascularization in neovascular age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 60(14), 4596–4605. <https://doi.org/10.1167/IOVS.19-27493>
- Xu, S., Sun, Z., Li, L., Liu, J., He, J., Song, D., Shan, G., Liu, H., & Wu, X. (2010). Induction of T cells suppression by dendritic cells transfected with VSIG4 recombinant adenovirus. *Immunology Letters*, 128(1), 46–50. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2009.11.003>

- Xue, M., & Jackson, C. J. (2015). Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Advances in Wound Care*, 4(3), 119–136. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2013.0485>
- Yuspa, S. H., Hennings, H., Tucker, O. W., Jaken, S., Kilkenny, A. E., & Roop, D. R. (1988). Signal transduction for proliferation and differentiation in keratinocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 548(1), 191–196. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb18806.x>
- Zhang, L., Mo, J., Swanson, K. V., Wen, H., Petrucelli, A., Gregory, S. M., Zhang, Z., Schneider, M., Jiang, Y., Fitzgerald, K. A., Ouyang, S., Liu, Z. J., Damania, B., Shu, H. B., Duncan, J. A., & Ting, J. P. Y. (2014). NLRC3, a member of the NLR family of proteins, is a negative regulator of innate immune signaling induced by the DNA Sensor STING. *Immunity*, 40(3), 329–341. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2014.01.010>
- Zhao, G., Usui, M. L., Lippman, S. I., James, G. A., Stewart, P. S., Fleckman, P., & Olerud, J. E. (2013). Biofilms and inflammation in chronic wounds. *Advances in Wound Care*, 2(7), 389–399. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2012.0381>
- Zuko, A., Oguro-Ando, A., Post, H., Taggenbrock, R. L. R. E., van Dijk, R. E., Altelaar, A. F. M., Heck, A. J. R., Petrenko, A. G., van der Zwaag, B., Shimoda, Y., Pasterkamp, R. J., y Burbach, J. P. H. (2016). Association of cell adhesion molecules contactin-6 and latrophilin-1 regulates neuronal apoptosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9, 143. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2016.00143>

Material suplementario

Debido al gran tamaño y la resolución limitada del documento, el material suplementario de este capítulo puede descargarse en: <https://zenodo.org/records/7470520>. A continuación, se describe el título de cada una de las figuras y tablas suplementarias en español.

Tabla Suplementaria 1. Resultados del cálculo ANOVA de dos vías para los índices de diversidad alfa entre grupos. Peces alimentados con dieta de control sin (C - N) y con herida (C - W). Peces alimentados con dieta probiótica sin (P - N) y con herida (P - W). No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Figura Suplementaria 1. Curvas de rarefacción de las muestras de microbiota cutánea de *S. aurata*

Figura Suplementaria 2. Abundancia relativa (%) por muestra de bacterias a nivel de filo en la microbiota asociada a la mucosa de la piel de peces alimentados con una dieta de control sin (C) y con herida (CW); así como los peces alimentados con la dieta probiótica sin (P) y con herida (PW). ETC: Sumatorio de OTU con abundancia relativa $<0.5\%$ en promedio.

Figura Suplementaria 3. Abundancia relativa (%) por muestras de bacterias a nivel de género en la microbiota asociada a la mucosa de la piel de peces alimentados con una dieta de control sin (C) y con herida (CW); así como los peces alimentados con la dieta probiótica sin (P) y con herida (PW). ETC: Sumatorio de OTU con abundancia relativa $<0.5\%$ en promedio; c__ representa los OTU no clasificados en esta categoría.

Figura Suplementaria 4. Abundancia relativa (%) por muestras de bacterias a nivel de género en la microbiota asociada a la mucosa de la piel de peces alimentados con una dieta de control sin (C) y con herida (CW); así como los peces alimentados con la dieta probiótica sin (P) y con herida (PW). ETC: Sumatorio de OTU con abundancia relativa $<0.5\%$ en promedio; g__ representa los OTU no clasificados en esta categoría.

Tabla Suplementaria 2. Tabla *DESeq2* con los resultados de la comparación de P vs. PW a nivel OTU, se mostraron todas las categorías de taxonomía.

Figura Suplementaria 5. Gráficos de volcán de genes expresados diferencialmente (DEG) entre tratamientos, datos de expresión representados con un valor de corte de FDR < 0.05 y un valor absoluto de cambio de $\log_2$ veces ≥ 1.3 . Los peces se alimentan con dieta control sin (C) y con herida (CW) o con dieta probiótica sin (P) y con herida (PW).

Figura Suplementaria 6. Genes enriquecidos en la categoría “Componentes celulares” (A) y “Función molecular” de GO a partir de los DEG de la comparación CW vs. PW. Izquierda, representación en red, donde los nodos marrones indican categorías funcionales a las que se unen los diferentes genes alterados en esa categoría. El color de rojo a azul indica los valores de cambio. Derecha, diagrama de puntos que ilustra las mismas categorías funcionales. El grosor de los puntos indica el número de genes alterados, y se proporciona el valor de p ajustado y el Generatio para cada categoría.

Figura Suplementaria 7. Genes enriquecidos en los términos KEGG a partir de los DEG de la comparación CW vs. PW. Izquierda, representación en red, donde los nodos marrones indican categorías funcionales a las que se unen los diferentes genes alterados en esa categoría. El color de rojo a azul indica los valores de cambio. Derecha, diagrama de puntos que ilustra las mismas categorías funcionales. El grosor de los puntos indica el número de genes alterados, y se proporciona el valor de p ajustado y el Generatio para cada categoría.

Figura Suplementaria 8. Genes enriquecidos para la base de datos Reactome a partir de los DEG de la comparación CW vs. PW. Izquierda, representación en red, donde los nodos marrones indican categorías funcionales a las que se unen los diferentes genes alterados en esa categoría. El color de rojo a azul indica los valores de cambio. Derecha, diagrama de puntos que ilustra las mismas categorías funcionales. El grosor de los puntos indica el número de genes alterados, y se proporciona el valor de p ajustado y el Generatio para cada categoría

Tabla Suplementaria 3. Resumen sobre el número de lecturas obtenidas por RNA-seq. 1-3 réplicas biológicas de alimento para peces con dieta control sin (C) y con herida (CW). Los peces se alimentan con dieta probiótica sin (P) y con herida (PW). % Respecto al total de lecturas en cada caso.

Tabla Suplementaria 4. Valor de las correlaciones entre los DEG frente a los géneros de microbiota cutánea de la comparación CW vs. PW



Capítulo 4





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Análisis del efecto de la alimentación con una dieta suplementada con la macroalga *Ulva ohnoi* sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*

Resumen

La inclusión de macroalgas en las dietas de los peces de piscifactoría ofrece la oportunidad de incorporar ingredientes dietéticos de valor añadido al alimento nutracéutico. Se han considerado varias especies de *Ulva* en formulaciones de alimentos acuícolas para diferentes peces de piscifactoría, y *Ulva ohnoi* se está aplicando recientemente. Sin embargo, antes es necesario evaluar los efectos de la inclusión de algas en la dieta del hospedador. Teniendo en cuenta el importante papel de la microbiota intestinal en el hospedador, es necesario estudiar los efectos que podría tener sobre ésta la inclusión de *U. ohnoi* en la dieta. En este estudio se ha llevado a cabo la caracterización de la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*, un pez plano de alto potencial en la acuicultura del sur de Europa, que recibió una dieta suplementada con *U. ohnoi* (5%) durante 90 días. Además, los perfiles funcionales de las comunidades bacterianas se han determinado mediante el programa PICRUSt (*Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*), un enfoque computacional para predecir la composición funcional de un metagenoma mediante el uso de datos de abundancia y una base de datos de genomas de referencia. Los resultados muestran que la administración dietética a largo plazo de una alimentación suplementada con *U. ohnoi* (5%) modula la microbiota intestinal de *S. senegalensis*, especialmente en la sección intestinal posterior. Se ha detectado una mayor abundancia relativa de *Vibrio* junto con una disminución del género *Stenotrophomonas* en peces que reciben la dieta *Ulva* en comparación con los peces alimentados con la dieta Control. Por primera vez se ha estudiado la influencia de la dieta sobre la posible funcionalidad de la microbiota intestinal de *S. senegalensis*. Los cambios en la composición bacteriana estuvieron acompañados de diferencias en la funcionalidad, siendo probable una mayor abundancia de genes implicados en la biodegradación y el metabolismo de los xenobióticos cuando se utilizó la dieta de *U. ohnoi*. Por el contrario, los porcentajes previstos

de genes asociados a la biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas, así como a la resistencia a los betalactámicos, se redujeron después de la alimentación con la dieta *Ulva*.

1. Introducción

Las macroalgas han sido consideradas como un ingrediente novedoso para la formulación de alimentos acuícolas en los últimos años (Guerreiro y col., 2019; Naylor y col., 2021; Wang y col., 2019; Yeganeh y Adel, 2019). Su composición nutricional incluye proteínas, lípidos y altos niveles de compuestos biológicamente activos como polisacáridos, pigmentos, polifenoles y vitaminas que podrían ejercer efectos beneficiosos en los peces de cultivo (Moutinho y col., 2018; Wells y col., 2017; Yaakob y col., 2014). En un primer momento, Mustafa y Nakagawa, (1995) resumieron el papel de las macroalgas en la nutrición de los peces y luego numerosos estudios han evaluado su potencial, no sólo como fuente de proteínas en la dieta, sino también como ingredientes funcionales para una variedad de especies de peces (Güroy y col., 2012; Peixoto y col., 2016, 2017; Yildirim y col., 2009; Zhu y col., 2016). Sin embargo, los efectos detectados dependieron de la dosis y fueron específicos de cada especie (Valente y col., 2016).

En este contexto, las especies de *Ulva* son una buena fuente de proteínas, minerales y vitaminas, especialmente vitamina C (García-Casal y col., 2007; Ortiz y col., 2006), y diferentes estudios tuvieron como objetivo evaluar su inclusión en la dieta en una amplia gama de especies de peces de cultivo, con resultados positivos en el rendimiento del crecimiento, la respuesta inmunitaria innata, la utilización del alimento y el estado general de salud de los peces (Kazemi y col., 2018; Magnoni y col., 2017; Silva y col., 2015; Valente y col., 2016; Vizcaíno y col., 2016; Wassef y col., 2013). También se conocen efectos negativos sobre el crecimiento de dietas con porcentajes de harina de *Ulva* superiores al 10% en alimentos acuícolas (Azaza y col., 2008; Diler y col., 2007; Wassef y col., 2005). Sin embargo, cuando se agrega a la dieta en porcentajes bajos, se han descrito beneficios, como un mejor crecimiento, eficiencia alimenticia, utilización de nutrientes, modulación de la respuesta inmunitaria y resistencia a enfermedades en varias especies de peces (Ergün y col., 2009; Fumanal y col., 2020; Moutinho y col., 2018; Mustafa y Nakagawa, 1995; Valente y col., 2006; Wassef y col., 2005).

Aunque se han aplicado diferentes especies de *Ulva* según el área geográfica (Prabhu y col., 2019), el interés sobre el potencial uso industrial de *Ulva ohnoi* y

su aplicabilidad o la de sus productos derivados en acuicultura es reciente (Fernández-Díaz y col., 2017; Martínez-Antequera y col., 2021; Norambuena y col., 2015). *U. ohnoi* está ampliamente distribuida y se cultiva fácilmente, exhibiendo tasas rápidas de crecimiento, incluso en sistemas de acuicultura con recirculación (Oca y col., 2019; Kang y col., 2021). Varios estudios han descrito efectos sobre el sistema inmunitario de peces tras la inclusión dietética de *U. ohnoi* (Fumanal y col., 2020; Martínez-Antequera y col., 2021). Además, se ha identificado la presencia de componentes nutraceuticos como el polisacárido ulvano en estos extractos (Fernández-Díaz y col., 2017). Por lo tanto, esta especie fue considerada en el presente estudio debido a la posibilidad de obtener fácilmente cantidades de biomasa algal suficientes, y su potencial uso como fuente de componentes nutraceuticos para el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*).

El lenguado senegalés es un pez plano con un gran potencial para la acuicultura marina debido a su alto valor de mercado y demanda por parte de los consumidores. Las recientes mejoras técnicas y de la gestión en el cultivo de *S. senegalensis* están generando avances importantes en la productividad, pero todavía hay cuestiones sin resolver con respecto a los aspectos nutricionales en condiciones de cultivo (Morais y col., 2016), y en la actualidad se está estudiando la inclusión de macroalgas en sus alimentos acuícolas.

Por otra parte, la microbiota presente en el tracto gastrointestinal tiene un papel relevante en la nutrición animal, el desarrollo, la modulación del sistema inmunitario y la resistencia contra patógenos (Ingerslev y col., 2014; b; Rawls y col., 2004; Salinas y col., 2006; Semova y col., 2012; Wang y col., 2018) y su composición depende de distintos factores, como la especie hospedadora, el nivel trófico, el entorno y los hábitos alimentarios (Eichmiller y col., 2016; Gonçalves y Gallardo-Escárate, 2017; Romero y col., 2014), las variaciones en los parámetros fisiológicos a lo largo del intestino (Ye y col., 2014) o los ingredientes funcionales o nutraceuticos (Ringø y col., 2016). La composición de *Ulva* sp., así como de *U. ohnoi*, incluye polisacáridos como el ulvano (Lahaye y Robic, 2007) y el almidón (Farias y col., 2017; Korzen y col., 2015) los cuales se ha demostrado que son hidrolizados por bacterias (Michel y Czjzek, 2013; Reisky y col., 2019), por lo que el metabolismo de estos compuestos por parte de la microbiota intestinal de peces de cultivo es de interés. En este contexto, recientemente, la administración durante un corto período de tiempo de una dieta con un bajo porcentaje de inclusión de *U. ohnoi*, demostró ejercer una modulación de la microbiota

intestinal en ejemplares de lenguado senegalés cultivados (Tapia-Paniagua y col., 2019). Sin embargo, la respuesta de la microbiota a la alimentación durante periodos más largos no se conoce.

Por otro lado, a pesar de que la diversidad microbiana del lenguado senegalés ha sido descrita por Tapia-Paniagua y col. (2019), hasta el momento no existe información sólida sobre la capacidad funcional de estas comunidades microbianas. En este sentido, algunas herramientas bioinformáticas pueden predecir la funcionalidad del microbioma, basándose en genes marcadores comúnmente utilizados para el análisis de diversidad, como el ADN_r 16S. En este trabajo, se ha utilizado el programa predictivo PICRUSt para describir los efectos de la suplementación dietética al 5% con *U. ohnoi* sobre los principales rasgos funcionales de la microbiota intestinal de *S. senegalensis*.

El objetivo del presente estudio fue investigar los efectos de la alimentación a largo plazo con una baja inclusión dietética de *U. ohnoi* en la composición microbiana intestinal de *S. senegalensis*. Además, se evaluaron los perfiles funcionales de las comunidades bacterianas mediante el uso del PICRUSt (Langille y col., 2013), y se evaluó la posible relación entre los cambios en la composición microbiana y la funcionalidad tras la alimentación con *U. ohnoi*.

2. Material y métodos

2.1. Composición y preparación de la dieta

U. ohnoi Hiraoka y Shimada, cepa UOHN120810, fue obtenida del canal de salida de las instalaciones piscícolas ubicadas en el centro del IFAPA “El Toruño”, situado en El Puerto de Santa María, Cádiz, España. Posteriormente, se mantuvieron clones vegetativos de la misma en cultivo. Para obtener la biomasa de *U. ohnoi* necesaria para la prueba de alimentación (1 kg /m³), los cultivos de esta cepa se ampliaron a tanques de 1000 L y se cultivaron en medio f/2 modificado (Guillard, 1975) con nitrato 1,8 mM y fosfato 0,1 mM preparado con agua de mar natural filtrada (0,2 µm) durante 2 semanas y bajo fotoperiodo de luz natural. Las algas se recolectaron, se enjuagaron con agua del grifo, se liofilizaron y se mantuvieron en un lugar seco hasta su uso como ingrediente en la dieta experimental.

LifeBioencapsulation S.L. (Spin-off, Universidad de Almería, España) fabricó dos dietas experimentales isonitrogénicas (55% en peso seco) e isolipídicas (15% en

peso seco). La dieta Ulva se formuló para incluir un 5% (m/m) de biomasa seca de *U. ohnoi*. Como control se utilizó una dieta no suplementada con algas. La composición de las dietas experimentales se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de ingredientes de las dietas experimentales utilizadas en el ensayo de alimentación

Ingredientes (g/kg peso seco)	Dieta Control	Dieta Ulva
Harina de pescado LT ¹	674	660
Harina de Ulva	-	50
Harina de calamar ²	50	50
Hidrolizado de proteína de pescado ³	50	50
Harina de <i>Krill</i> ²	10	10
Harina de gamba ²	10	10
Harina de gluten ²	20	20
Proteína de soja concentrada ⁴	20	20
Aceite de pescado	30	29
Maltodextrina de lecitina de soja	20	20
Cloruro de colina	10	10
Premezcla de vitamina y minerales	20	30
Goma guar	15	15
Alginato	15	15

¹(69,4% proteína total, 12,3% lípido bruto), Norsildemel (Bergen, Noruega); ²Proveedor local (Lifebioencapsulation S.L., Almería España); ³ Sopropeche (Francia) (81% proteína total, 8,8% lípidos totales); ⁴ DSM (Francia); (65% proteína total, 8% lípido bruto) ⁵Sigma-Aldrich (Madrid, España); ⁶Premezcla mineral y vitamínica según Vizcaíno y col. (2018). Composición proximal de la dieta control: 55,2% proteína total, 12,4% lípidos total, 3,0% fibra, 12,8% cenizas; y de la dieta Ulva: 55,0% proteína total, 12,0% lípidos totales, 3,3% fibra, 13,1% cenizas.

Los componentes del alimento fueron triturados y combinados en una mezcladora de cinta de hélice vertical (Sammic BM-10, con una capacidad de 10 litros, Sammic en Azpeitia, España) previo a la incorporación de aceite de pescado y cloruro de colina diluido. Todos los ingredientes se mezclaron durante 15 min y, luego, se añadió agua (300 ml/kg) a la mezcla para obtener una masa homogénea. La masa se pasó a través de una extrusadora de laboratorio de un solo tornillo (Miltenz 51SP, JSConwell Ltd., Nueva Zelanda), para formar gránulos de 1 a 2 mm (diámetro) y 2 a 3 mm (longitud). El cilindro extrusor constaba de cuatro secciones y el perfil de temperatura en cada sección (desde la entrada hasta la salida) era de 100, 95, 90 y 85°C, respectivamente. Finalmente, los pellets se secaron a temperatura ambiente durante 24 h y se guardaron en bolsas de plástico selladas a -20 °C hasta su uso.

2.2. Mantenimiento de peces

Se obtuvieron juveniles de lenguado senegalés (*S. senegalensis*) ($10,7 \pm 2,9$ g, peso corporal inicial medio) de un criadero comercial (Cupimar SA, San Fernando, Cádiz, España) y se transportaron a las instalaciones de investigación del IFAPA El Toruño (El Puerto de Santa María, Cádiz, España) donde se realizó el ensayo de alimentación por técnicos especializados. Los ejemplares fueron colocados a una densidad de $1,5 \text{ kg/m}^2$, en 6 tanques conectados a una recirculación cerrada que consta de un filtro mecánico, un espumador, luz ultravioleta y un biofiltro. Los animales se alimentaron diariamente con una dieta que contenía un 2% de biomasa de pescado, considerada como dieta de control, durante 10 días para aclimatar a los peces a las condiciones experimentales. Después del período de aclimatación, las dietas experimentales se asignaron aleatoriamente a grupos por triplicado. Los peces ($12,3 \pm 2,0$ g de peso corporal medio) de cada conjunto de tres tanques fueron alimentados con una de las dos dietas experimentales: dieta control o dieta que contenía *U. ohnoi* al 5% (dieta Ulva) durante 90 días, a razón del 3% de su peso. Se controlaron diferentes parámetros durante todo el período experimental. La temperatura, pH, salinidad y oxígeno se mantuvieron constantes en $19,9 \pm 0,7$ °C; $7,8 \pm 0,2$; $25,7 \pm 1,5$ ‰ y $7,0 \pm 0,4$ mg/L, respectivamente. Los nitritos y el amoníaco se controlaron una vez por semana (los valores fueron inferiores a 0,1 mg/L).

Al final de la prueba de alimentación, los peces se mantuvieron en ayunas durante 12 h antes del muestreo. Los lenguados se sacaron cuidadosamente (N = 14) de sus respectivos tanques y se transfirieron a un tanque nuevo que contenía aceite de clavo (200 ppm) para sacrificarlos. Se extrajeron asépticamente los intestinos completos de siete peces por tratamiento, y se dividieron en dos secciones de igual longitud (anterior y posterior), que se almacenaron por separado en Trisure, a -80 °C, hasta su posterior análisis.

2.3. Procedimientos de muestreo y análisis de secuencia

Las muestras intestinales individuales de los ejemplares de *S. senegalensis* con 1 ml de PBS, pH 7,2, y se centrifugó una alícuota de 1 ml por muestra (N = 28) ($1000 \times g$, 5 min). El ADN total se extrajo de cada muestra según las especificaciones del fabricante utilizando Trisure (Bioline, España). Posteriormente, se precipitaron 20 µl de ADN total con 2 µl de acetato de sodio 3 M y 46 µl de isopropanol para su purificación. Luego, el ADN se centrifugó durante 3 minutos a $12\,000 \times g$, a 4 °C, y se descartaron los sobrenadantes y los sedimentos se

enjuagaron con etanol al 70% frío. Después de la centrifugación durante 5 a 15 minutos a $12\,000 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, los sobrenadantes se descartaron nuevamente y los sedimentos se secaron al aire. Finalmente, el ADN se resuspendió en agua. La calidad y la integridad del ADN se visualizaron mediante electroforesis en gel, y la concentración y la pureza se determinaron utilizando un fluorímetro Qubit 2.0 (Thermo Scientific, Alemania). El ADN aislado se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento posterior y se utilizaron 30 ng para análisis posteriores.

Las librerías para la secuenciación fueron construidas por el Servicio de Ultrasecuenciación del Centro de Bioinnovación (Universidad de Málaga, España) utilizando la plataforma Illumina® MiSeq. Seguidamente, la secuenciación por pares de Illumina ($2 \times 300\text{ pb}$) de cada muestra se llevó a cabo utilizando los cebadores 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) y 805R (GACTACHVGGGTATCTAATCC), dirigidos a las regiones V3-V4 del gen ADNr 16S (Klindworth y col., 2013).

Las lecturas de Illumina se visualizaron previamente con el programa FastQC (Andrews y col., 2010) para evaluar la calidad de las secuencias. Posteriormente, se procesaron las lecturas mediante un flujo de trabajo basado en el paquete de programa MOTHUR (versión 1.39.5) (Schloss y col., 2009). Se fusionaron y procesaron las lecturas demultiplexadas de extremos emparejados, recortando las secuencias del cebador según el tamaño del amplicón (400-600 pb). UCHIME (versión 4.2., <https://drive5.com/uchime>) (Edgar y col., 2011) se utilizó para detectar y eliminar quimeras; las secuencias no quiméricas representativas restantes fueron alineadas y agrupadas en unidades taxonómicas operativas (OTU) utilizando la base de datos Greengenes (versión 13.5, McDonald y col., 2012) con un límite de identidad del 97 % y un umbral de recuento total se estableció en 0,005 % (Bokulich y col., 2013).

Después de generar el perfil taxonómico de las muestras de microbiota, se llevó a cabo la comparación de taxones presentes en las muestras. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando librerías de R *phyloseq* y *vegan* (McMurdie y Holmes, 2013). Para determinar el nivel de profundidad de secuenciación, se obtuvieron curvas de rarefacción trazando el número de OTU observadas frente al número de secuencias y se calculó el coeficiente de cobertura de Good. Las muestras se normalizaron mediante el cálculo de las curvas de rarefacción. La diversidad alfa se estimó utilizando los índices de Chao1, Shannon y Simpson para determinar la diversidad estructural, taxonómica y filogenética,

respectivamente. Los resultados se representaron a nivel taxonómico de filo, clase, familia y género.

La predicción de las funciones de la microbiota se realizó utilizando PICRUST (versión 1.1.3), una herramienta diseñada para inferir las funciones de la microbiota a partir de datos de secuenciación del amplicón ADNr 16S, utilizando una base de datos de las funciones predeterminadas (Langille y col., 2013). Para ello se utilizó el conjunto de datos calculado después de normalizar el número de copias de ADNr 16S al tamaño de la muestra. Se obtuvieron puntuaciones del índice de taxón secuenciado más cercano (NSTI) para evaluar la precisión de las funciones predichas y se clasificaron con un valor de confianza del 97% utilizando la base de datos KEGG (Enciclopedia de genes y genomas de Kioto). Se calcularon valores para todas las categorías funcionales (Kanehisa y col., 2014) y se compararon los perfiles funcionales bacterianos hasta el nivel 3 de las categorías KEGG.

2.4. Cálculos y análisis estadísticos

Los parámetros de crecimiento y las tasas de supervivencia se calcularon según las siguientes fórmulas:

Tasa de aumento de peso (WGR) (%) = $100 \times (\text{peso corporal final} - \text{peso corporal inicial}) / \text{peso corporal inicial}$; factor de conversión alimentaria (FCR) = $\text{alimento seco consumido (g)} / \text{aumento de peso húmedo (g)}$ y Tasa de supervivencia (%) = $100 \times \text{número final de peces} / \text{número inicial de peces}$.

Se comprobó la normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) y la homogeneidad de la varianza (prueba de Levene) para todos los datos antes de determinar las diferencias entre las dos dietas experimentales y se utilizó la prueba *t* de Student para comparar medias si cumplía estos requerimientos. Todas las pruebas se realizaron con el programa XLSTAT y la significación se estableció para $p < 0,05$.

Se llevó a cabo un análisis multivariado de los perfiles de abundancias de los OTU mediante el uso de un análisis de coordenadas principales (PCoA), utilizando la métrica de Bray-Curtis para visualizar las diferencias entre la comunidad microbiana de cada grupo dietético. Además, para probar la hipótesis de que no hay diferencias entre la microbiota de las secciones intestinales y las dietas analizadas, se calcularon las diferencias estadísticas entre las matrices de disimilitud obtenidas con el índice de Bray-Curtis mediante análisis multivariado permutado de la varianza (PERMANOVA) con 999

permutaciones, utilizando el programa PAST (versión 3.16) (Hammer y col., 2001).

Se determinó el tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LDA) mediante el algoritmo LEfSe (Segata y col., 2011) para caracterizar las diferencias entre taxones microbianos de las dietas y entre las dos secciones intestinales diferentes. La ejecución del análisis LEfSe se llevó a cabo utilizando la plataforma Galaxy (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>). Los taxones con un valor alfa menor a 0,05 fueron considerados significativos, determinados inicialmente mediante la prueba factorial de suma de rangos de Kruskal-Wallis, y posteriormente confirmados por la prueba pareada de Wilcoxon, con un umbral establecido en |2,0| para la magnitud del efecto en el análisis discriminante lineal (LDA).

Se utilizó el programa STAMP (Análisis estadístico de perfiles metagenómicos) para analizar los valores previstos de las abundancias de las funciones basadas en la microbiota de las secciones intestinales y las dietas investigadas, utilizando la prueba de comparación múltiple ANOVA seguida de Tukey-Kramer (p corregida $< 0,05$).

2.5. Declaración del comité de ética

El ensayo *in vivo* fue realizado Instituto de Investigación y Capacitación Agraria y Pesquera (IFAPA) bajo procedimientos autorizados por el Comité de Bioética y Bienestar Animal que otorgó el número de registro 17/11/2016/171 según las autoridades nacionales de regulación del cuidado y experimentación animal. El estudio con animales fue revisado y aprobado por la Unión Europea (2010/63/UE) y la legislación española (RD 1201/2005 y RD 53/2013) para el uso de animales de laboratorio.

2.6. Declaración de disponibilidad de datos

Los datos presentados en este estudio se pueden encontrar en repositorios *online*. El nombre del repositorio y el número de acceso al proyecto se pueden encontrar a continuación: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, PRJNA765168.

3. Resultados

3.1. Crecimiento de los peces y descripción general de la secuenciación de la microbiota intestinal

La mortalidad de los peces durante el período experimental estuvo por debajo del 5%. Se observaron valores de disminución significativos en las tasas de peso corporal final y de ganancia de peso para los peces alimentados con una dieta suplementada al 5% de *U. ohnoi*; sin embargo, no se detectaron diferencias en el FCR según la dieta suministrada (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de crecimiento de los ejemplares juveniles de estudio de *S. senegalensis*

Determinación	Dieta Control	Dieta Ulva	Valor de <i>p</i>
FBW (g)	55,46 ± 1,16a	50,05 ± 1,09b	0,01
WGR (%)	351,97 ± 9,50a	307,92 ± 8,94b	0,00
FCR	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,53

Composición aproximada de la dieta de control: 55,2% de proteína total, 12,4% de lípidos totales, 3,0% de fibra, 12,8% de ceniza, y la dieta de Ulva: 55,0% de proteína total, 12,0% de lípidos totales, 3,3% de fibra, 13,1% de ceniza. FBW: peso corporal final; WGR: índice de ganancia de peso; FCR: factor de conversión alimentaria. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos experimentales (*t* de *student*, *p* < 0,05)

Se extrajo ADN del total de 28 muestras del intestino de los lenguados; 7 individuos de *S. senegalensis* por dieta y 2 regiones intestinales por ejemplar. En total, tras la secuenciación se obtuvieron 5 109 193 lecturas sin procesar en ambas direcciones. Los amplicones no específicos y las quimeras se eliminaron en el filtrado de calidad inicial, obteniéndose un total de 1 453 999 lecturas, con 51 928,53 ± 17 165,22 (media ± DE) secuencias por muestra; agrupándose en un total de 667 OTU (límite de similitud del 97% contra la base de datos Greengenes). Las secuencias fueron filtradas mediante curvas de rarefacción hasta el tamaño mínimo de la librería de 30 284 lecturas (Figura Suplementaria 1), y también se eliminaron los singleton y doubleton. Tras el procesamiento, se obtuvieron 190 OTU que se utilizaron para análisis posteriores. El valor del estimador de cobertura de Good fue 99,94 ± 0,02 (media ± DE) (que osciló entre 99,93 a 99,94%), lo que indica una profundidad de secuenciación adecuada.

Se calcularon índices de diversidad alfa para los datos de microbiota de peces alimentados con las dietas Control y Ulva en la sección anterior y posterior. No se observaron diferencias estadísticas en la riqueza de especies (Chao1) ni en los índices de Shannon y Simpson entre la microbiota de los especímenes

alimentados con la dieta Control o con la dieta Ulva, independientemente de las secciones analizadas (Tablas 3A, 3B).

Tabla 3A. Diversidad alfa de comunidades bacterianas en secciones del tracto intestinal anterior (A) de especímenes de *S. senegalensis*

Índice	Dieta Control A	Dieta Ulva A	Valor de <i>p</i>
Chao1	224,50 ± 45,10	152,35 ± 30,75	0,56
Shannon	1,77 ± 0,26	1,74 ± 0,20	0,82
Simpson	0,65 ± 0,14	0,69 ± 0,13	0,66

Los valores representan la media ± DE. No se encontraron diferencias significativas entre Control A y Ulva A (*t* de Student, *p* > 0,05).

Tabla 3B. Diversidad alfa de comunidades bacterianas en secciones del tracto intestinal posterior (P) de especímenes de *S. senegalensis*

Índice	Dieta Control P	Dieta Ulva P	Valor de <i>p</i>
Chao1	142,92 ± 36,18	152,35 ± 30,75	0,56
Shannon	1,77 ± 0,26	1,74 ± 0,20	0,82
Simpson	0,65 ± 0,14	0,69 ± 0,13	0,66

Los valores representan la media ± DE. No se encontraron diferencias significativas entre Control P y Ulva P (*t* de Student, *p* > 0,05).

3.2. Composición de la microbiota gastrointestinal de *S. senegalensis*

La microbiota intestinal de *S. senegalensis* alimentada con las dietas Control y Ulva estuvo dominada por *Proteobacteria*, *Tenericutes* y *Firmicutes* en ambas secciones intestinales (Figura 1). En todos los casos, *Proteobacteria* fue el filo más abundante, con una abundancia relativa del 68,8 al 91,7%. Además, las espiroquetas también estuvieron presentes, siendo un filo predominante en la microbiota intestinal posterior de los peces alimentados con ambas dietas (13,5 – 13,7%).

A nivel de clase (Figura 2 y Figura 2 suplementaria), *Gammaproteobacteria* fue la clase más abundante en ambas secciones intestinales (con una abundancia de entre 66,6 y 88,9%), seguida de *Mollicutes* (entre 6,0 y 15,3%). Curiosamente, la microbiota de especímenes de *S. senegalensis* alimentados con la dieta Ulva mostró una disminución de la abundancia relativa de *Mollicutes* junto con un aumento de *Gammaproteobacteria*, siendo más evidente en las secciones anteriores, aunque estos cambios no se consideraron estadísticamente significativos (prueba de Wilcoxon, *U* = 19, *p* = 0,15) (Figura 2).

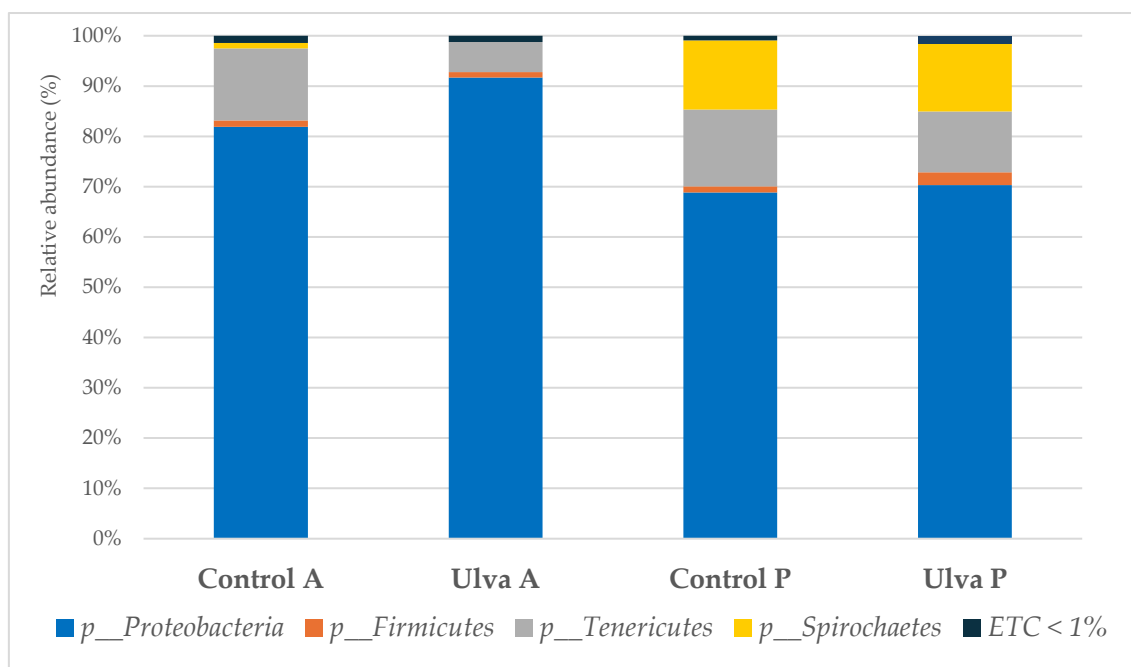


Figura 1. Promedio de la abundancia relativa entre las muestras de microbiota intestinal a nivel de filo de *S. senegalensis* alimentado con una dieta de control (Control) y suplementada con 5% de *Ulva ohnoi* (Ulva) durante 90 días. A: sección anterior; P: sección posterior. ETC <1% indica abundancia relativa inferior al 1%.

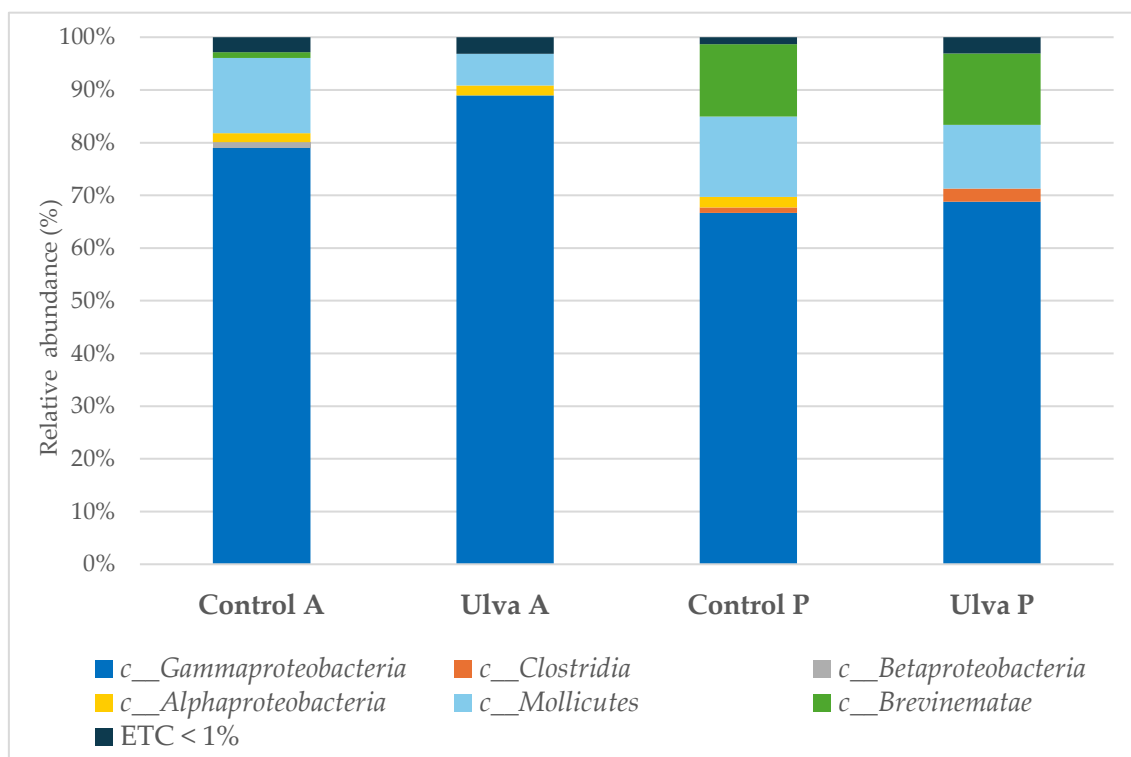


Figura 2. Promedio de la abundancia relativa entre las muestras de microbiota intestinal a nivel de clase de *S. senegalensis* alimentado con una dieta de control (Control) y suplementada con 5% de *Ulva ohnoi* (Ulva) durante 90 días. A: sección anterior; P: sección posterior. ETC <1% indica abundancia relativa inferior al 1%.

El análisis taxonómico a nivel de familia mostró una mayor abundancia relativa de miembros de *Pseudomonadaceae*, siendo predominante en ambas secciones intestinales cuando los especímenes de *S. senegalensis* fueron alimentados con dieta control (Figura 3 y Figura 3 suplementaria). Sin embargo, la abundancia de *Vibrionaceae* aumentó en ambas secciones intestinales de los peces alimentados con la dieta Ulva en comparación con los alimentados con la dieta Control.

Mycoplasmataceae, *Xanthomonadaceae* y *Brevinemataceae* se detectaron en porcentajes de abundancia más bajos en todas las muestras independientemente de la sección y la dieta consideradas, aunque la abundancia relativa de las dos primeras fue mayor en los peces que recibieron la dieta Control. Finalmente, el estudio a nivel de género (Figura 4 y Figura 4 suplementaria) mostró a *Vibrio* como el miembro más abundante en la microbiota de los especímenes alimentados con la dieta Ulva, mientras que las OTU identificadas como de la familia “*Pseudomonadaceae_unclassified*” fueron las más frecuentes en la microbiota intestinal cuando se suministró dieta control.

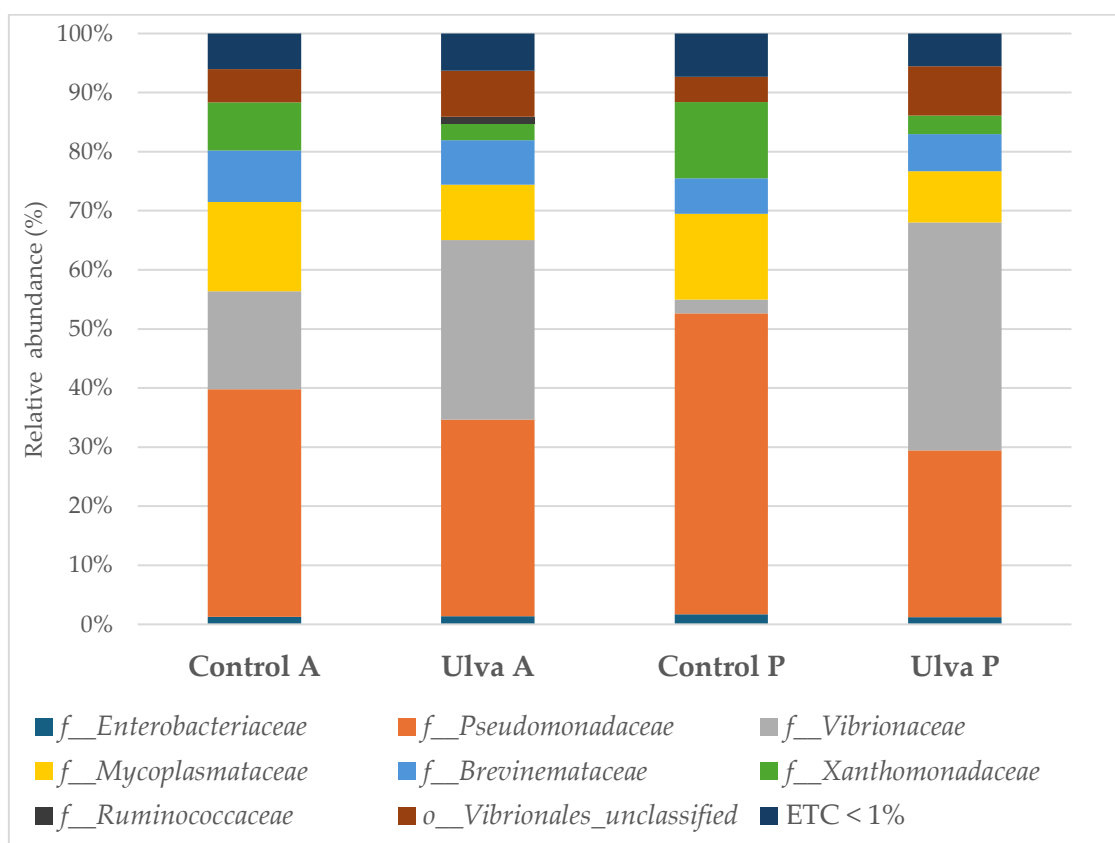


Figura 3. Promedio de la abundancia relativa entre las muestras de microbiota intestinal a nivel de familia de *S. senegalensis* alimentado con una dieta de control (Control) y suplementada con 5% de *Ulva ohnoi* (Ulva) durante 90 días. A: sección anterior; P: sección posterior. ETC <1% indica abundancia relativa inferior al 1%.

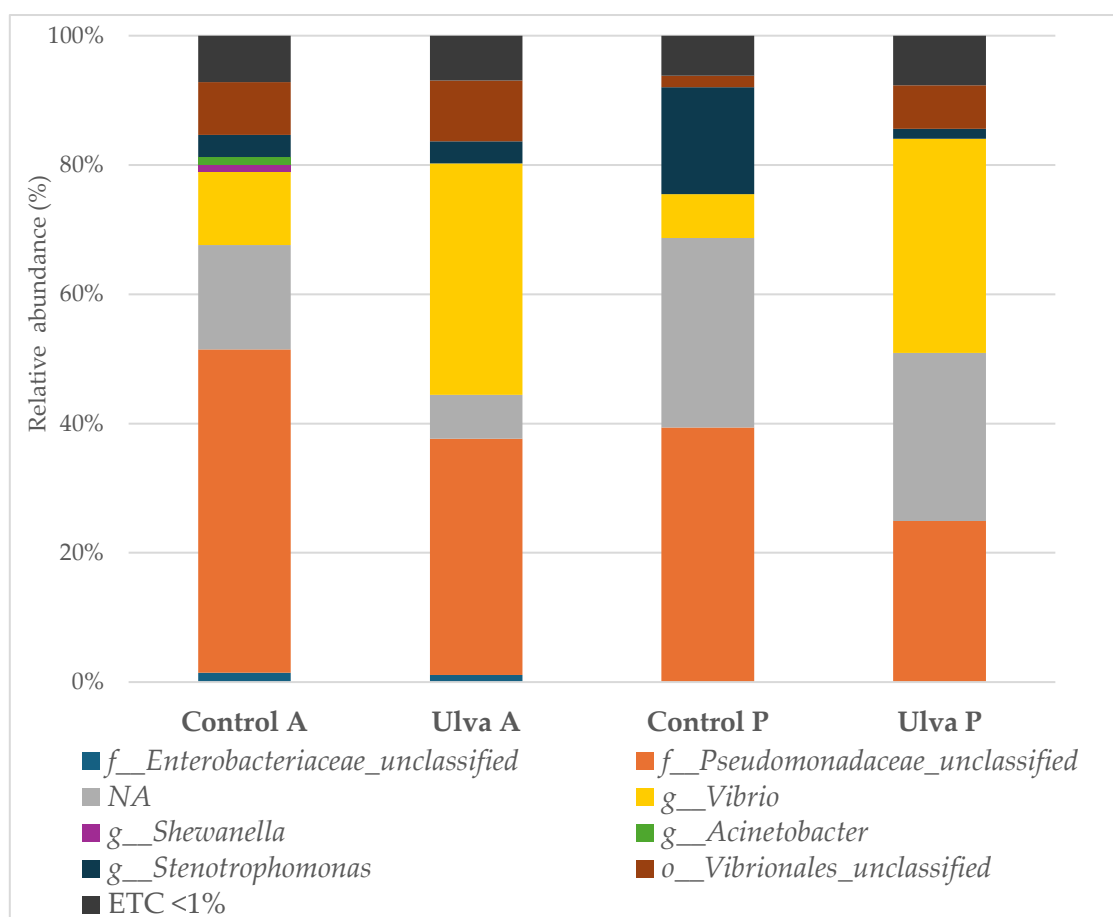


Figura 4. Promedio de la abundancia relativa entre las muestras de microbiota intestinal a nivel de género de *S. senegalensis* alimentado con una dieta de control (Control) y suplementada con 5% de *Ulva ohnoi* (Ulva) durante 90 días. A: sección anterior; P: sección posterior. NA: OTU no clasificadas según la base de datos a nivel de género. ETC <1% indica abundancia relativa inferior al 1%.

3.3. Modulación de la microbiota intestinal mediante una dieta conteniendo *U. ohnoi*

Se realizó un análisis de diversidad beta para explorar las diferencias en las comunidades bacterianas según la dieta que recibieron los peces. La representación gráfica del análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en las distancias de Bray-Curtis entre las OTU detectadas no mostró agrupaciones evidentes entre las muestras anteriores asociadas a la dieta (Figura 5A). Por el contrario, las muestras de microbiota de las secciones intestinales posteriores se separaron claramente según la dieta recibida (Figura 5B). Además, la prueba PERMANOVA confirmó que la composición de la microbiota posterior cambió según la dieta, mientras que no se obtuvieron valores significativos para las secciones intestinales anteriores analizadas (PERMANOVA, $F=3,40$, $p=0,00$ y $p=0,49$, respectivamente).

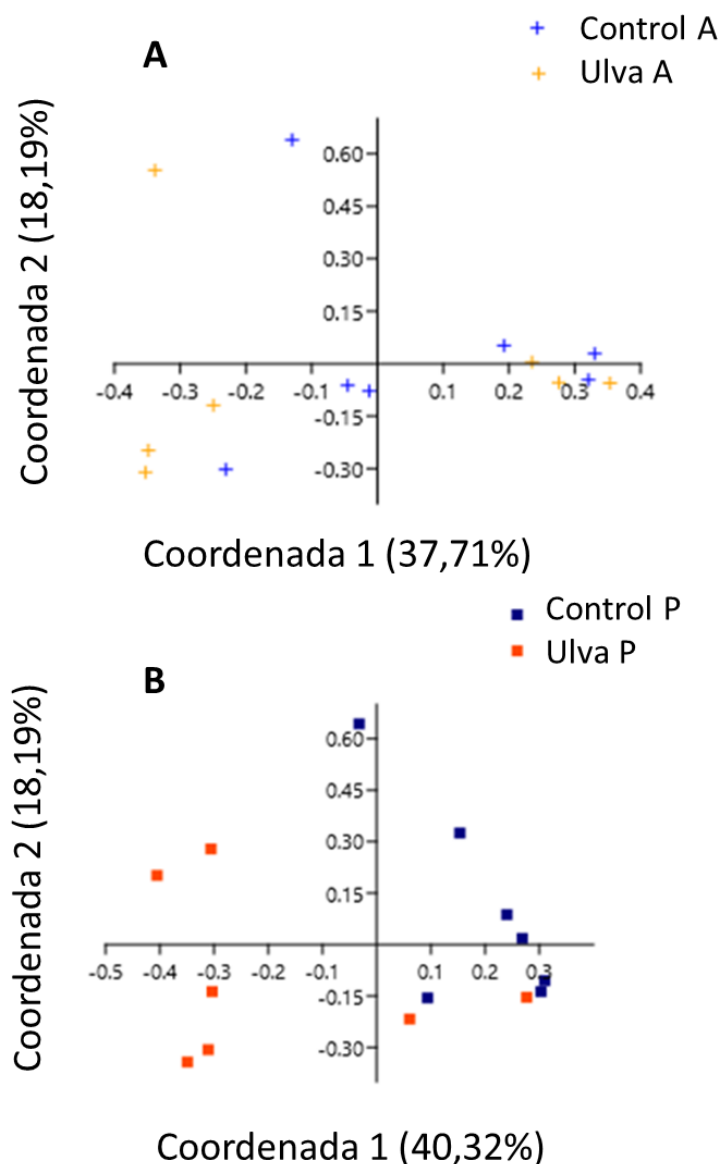


Figura 5. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de la composición de la comunidad bacteriana a nivel de OTU según la matriz de distancias de Bray-Curtis. Las muestras individuales están coloreadas de acuerdo con la dieta recibida por los especímenes de *S. senegalensis*: dietas control (Control) y dieta suplementada con 5% *U. ohnoi* (Ulva) durante 90 días. Sección intestinal (A) anterior, (B) posterior.

Para determinar los taxones que tienen más probabilidades de explicar las diferencias entre las dietas experimentales y las secciones, se llevó a cabo un análisis LEfSe (prueba de Kruskal-Wallis y Wilcoxon $p < 0,05$ y tamaño del efecto $LDA > |2,00|$). En la Figura 6 se muestran los histogramas de las puntuaciones de LDA que se calcularon para los taxones diferencialmente abundantes en la microbiota intestinal de especímenes de *S. senegalensis* alimentados con dietas Control y Ulva y las secciones anterior y posterior.

Al comparar la microbiota de las secciones anteriores de peces alimentados con la dieta Control y Ulva, solo el género *Shewanella* se detectó como significativamente diferente (prueba de Wilcoxon, $U=7$, $p=0,02$) (Figura 6A). Por el contrario, la microbiota de las secciones intestinales posteriores de peces alimentados con la dieta Control mostró una abundancia significativamente mayor en el género *Stenotrophomonas* (familia *Xanthomonadaceae*, orden *Xanthomonadales*), mientras que en el género *Vibrio* (taxón previamente nombrado, prueba de Wilcoxon, $U=0$, $p=0,00$), incluido en el orden Vibrionales (prueba de Wilcoxon, $U=2$, $p=0,00$), fue diferencialmente más abundante en la microbiota de los peces alimentados con el alga (Figura 6B).

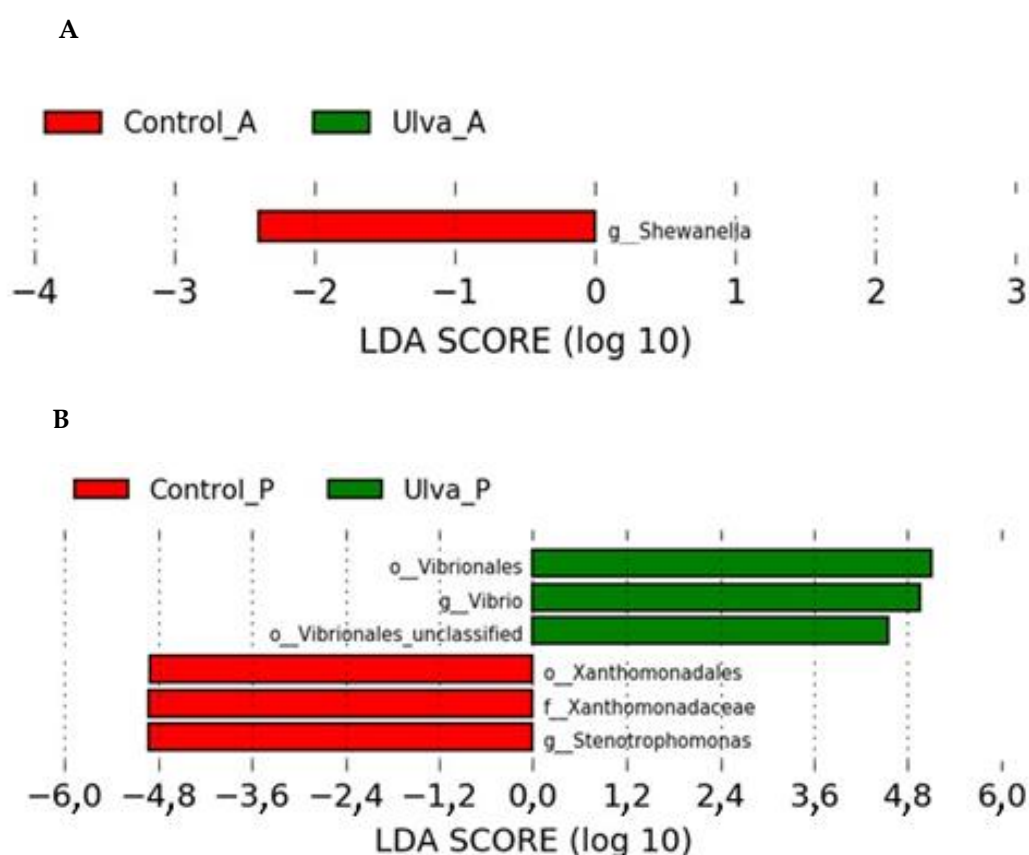


Figura 6. Puntuaciones de LDA para los taxones diferencialmente abundantes en la microbiota del tracto intestinal de especímenes de *S. senegalensis* alimentados con dietas de control (Control) y suplementadas con *Ulva ohnoi* (Ulva) durante 90 días (prueba de Kruskal-Wallis y Wilcoxon, $p < 0,05$ y tamaño del efecto de LDA $> |2,00|$). (A) sección anterior; (B) sección posterior.

3.4. Función prevista de la microbiota gastrointestinal

Se realizó un análisis PICRUST para predecir las capacidades funcionales de las comunidades microbianas intestinales detectadas en especímenes de *S. senegalensis* que recibieron las dos dietas analizadas. El bajo valor de NSTI (0,07

$\pm 0,07$) obtenido en el análisis PICRUSt indicó una buena precisión de predicción. Se identificaron un total de 328 funciones KEGG.

Sólo se detectaron diferencias significativas en la composición funcional de las comunidades microbianas de peces alimentados con ambas dietas en las secciones intestinales posteriores. Así, la microbiota de los peces alimentados con una dieta suplementada con *U. ohnoi* mostró mayores porcentajes en la predicción de genes implicados en “procesos y señalización celular” (portadores de transferencia de electrones), “metabolismo energético” (metabolismo del metano) y “biodegradación y metabolismo xenobióticos” (degradación de dioxinas, xileno y nitrotolueno) (Figura 7). Por el contrario, disminuyó la abundancia de genes implicados en la “biosíntesis de otros metabolitos secundarios” (biosíntesis de penicilina y cefalosporinas), “metabolismo de lípidos” (metabolismo del ácido araquidónico), “metabolismo de otros aminoácidos” (resistencia a betalactámicos), “replicación y reparación” (cromosoma y unión de extremos no homólogos) y la “transcripción” (maquinaria de transcripción) (Figura 7).

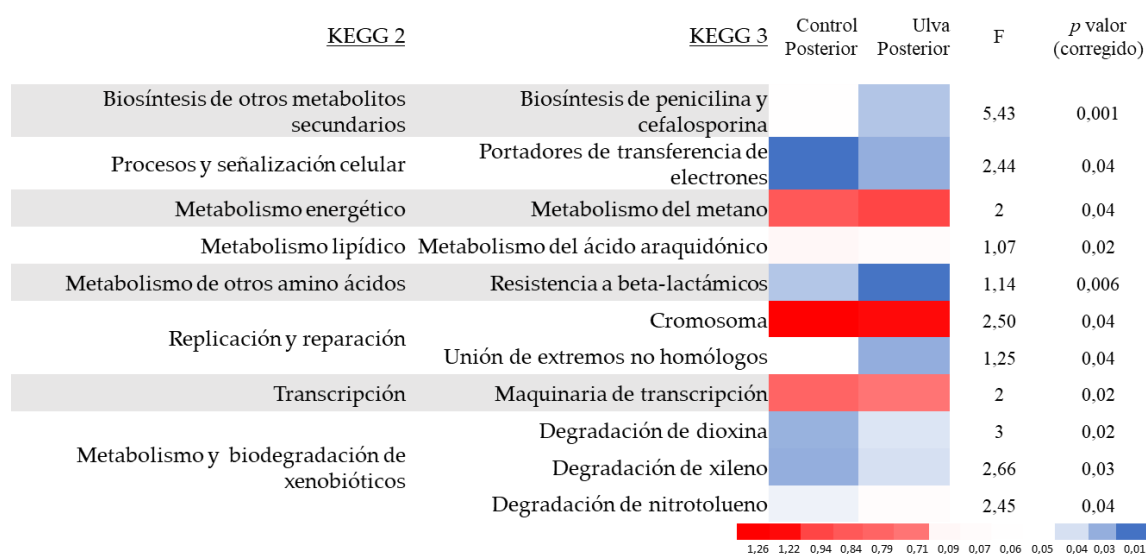


Figura 7. Mapa de calor que muestra las diferencias significativas (ANOVA, F , $p < 0,05$) en la funcionalidad microbiana inferida (PICRUSt) entre la microbiota intestinal posterior de *S. senegalensis* alimentada con control (Control) y con dieta suplementada con 5% de *U. ohnoi* (Ulva) durante 90 días. Abundancia relativa de secuencias asociadas con funciones KEGG de las muestras.

4. Discusión

Las macroalgas marinas representan una fuente prometedora de proteínas sostenibles y sustancias con valores nutraceuticos, con efectos sobre la fisiología y el sistema inmunitario de los peces (Araújo y col., 2021; Cerezuela y col., 2012; Fumanal y col., 2020; Packer y col., 2016; Ponce y col., 2020).

En el presente trabajo, la disminución de las tasas de crecimiento y conversión alimenticia observadas en *S. senegalensis* que reciben dieta *Ulva* concuerdan con los resultados obtenidos en estudios previos realizados en peces de cultivo, como la trucha arcoíris (Yildirim y col., 2009) y en el lenguado senegalés (Tapia-Paniagua y col., 2019). El reducido crecimiento observado en peces alimentados con la dieta suplementada con *Ulva* se ha atribuido a la presencia de factores antinutritivos como los inhibidores de proteasas (Sáez y col., 2013; Vizcaíno y col., 2016; 2019), que podrían haber inhibido las proteasas digestivas en el intestino y afectar negativamente a la absorción de nutrientes.

La función y estabilidad de los ecosistemas microbianos están influenciadas por la riqueza de especies y grupos funcionales (Bell y col., 2005), que, junto con la biodiversidad, son esenciales para proteger la funcionalidad del ecosistema frente a perturbaciones (De y col., 2014; Gonçalves y Gallardo-Escárate, 2017). Diferentes estudios indican que la composición y los cambios de la dieta son factores importantes en la modulación de las comunidades microbianas del intestino en vertebrados (Askarian y col., 2012; Ghanbari y col., 2015; Gonçalves y Gallardo-Escárate, 2017; Ringø y col., 2016; Sullam y col., 2012). Nuestros resultados muestran que la administración a *S. senegalensis* de una dieta suplementada al 5% con *U. ohnoi* no indujo diferencias significativas en los índices de diversidad alfa de la microbiota intestinal. Estos resultados contrastan con los valores significativamente mayores del índice de diversidad de Shannon que se obtuvieron cuando se administró la misma dieta a la misma especie de pez durante un período más corto (45 días) (Tapia-Paniagua y col., 2019). El índice de Shannon, que refleja la diversidad de toda la comunidad microbiana, evidencia diferencias notables en función del período de alimentación de la dieta suplementada. Estas discrepancias podrían atribuirse a un proceso de adaptación de las comunidades microbianas a la nueva dieta, sugiriendo que el ajuste de la microbiota se logra de manera más completa después de 90 días. Por lo tanto, un índice de diversidad similar puede deberse a un número similar de especies y al promedio o uniformidad de la distribución individual entre las especies, aunque las especies pueden ser diferentes. En este contexto, se ha informado que la edad

de los peces tuvo efectos significativos en la diversidad beta, pero no sobre la alfa, de la microbiota intestinal tanto en hábitats de agua dulce como salada (Zhao y col. 2020)

La composición general detectada en la microbiota intestinal de *S. senegalensis* en este estudio corrobora que los miembros del filo *Proteobacteria* dominan la microbiota intestinal en especímenes de *S. senegalensis*, mientras que *Tenericutes* representa el segundo filo más abundante en este ambiente (Tapia-Paniagua y col., 2019). De manera similar, estudios previos a nivel de clase también han identificado gammaproteobacterias y *Mollicutes* en el tracto intestinal de *S. senegalensis* (Tapia-Paniagua y col., 2014; 2019). El análisis taxonómico a nivel de familia demostró que *Pseudomonadaceae* y *Vibrionaceae* fueron las proteobacterias detectadas con mayor frecuencia en el presente trabajo, al igual que en el estudio previo realizado con ejemplares más jóvenes de lenguado senegalés por Tapia-Paniagua y col. (2019).

La dieta se considera uno de los factores más relevantes que afectan a la microbiota intestinal (Webster y col., 2020). Aunque la inclusión en la dieta de un bajo nivel de *U. ohnoi* no influyó en los índices de diversidad alfa de la microbiota intestinal de *S. senegalensis*, los resultados obtenidos indican que se produjeron cambios sutiles en la composición de las comunidades microbianas de las sección intestinal posterior después de una alimentación a largo plazo con una dieta suplementada con el 5% de esta macroalga. De esta forma, se observó modificaciones en la abundancia de miembros del género *Stenotrophomonas* (de la familia *Xanthomonadaceae*) en tanto que aumentaba la del género *Vibrio*.

Se ha informado que el género *Stenotrophomonas* es un miembro predominante de la microbiota intestinal de peces de cultivo (He y col., 2016; Puello y col., 2018; Tapia-Paniagua y col., 2011), incluidas larvas y juveniles de *S. senegalensis* (Tapia-Paniagua y col., 2014, 2019), y ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con *U. ohnoi* (Tapia-Paniagua y col., 2019). Además, este género ha sido identificado como uno de los principales grupos que comprenden la microbiota de especies marinas como los rorcuales (familia *Balaenopteridae*) (Toro y col., 2021). Este género incluye especies consideradas patógenos oportunistas de peces como *S. maltophilia* (Abraham y col., 2016; Geng y col., 2010), mientras que otras cepas aisladas de la microbiota de invertebrados marinos (Reina y col., 2019) y peces (Torabi Delshad y col., 2018) han demostrado la capacidad de degradar una amplia gama de moléculas de señalización de N-acil-homoserina esenciales para la detección de *quorum*. Este sistema de señalización (*quorum sensing*) está

involucrado en el control de la expresión de genes relacionados con factores de virulencia, informándose que las moléculas que anulan la señalización (*quorum quenching*) dan como resultado una atenuación de la virulencia del patógeno (Reina y col., 2019). En este contexto, también se conocen cepas de *Stenotrophomonas* que son probióticos vegetales, y que muestran capacidades para degradar y reducir compuestos tóxicos (Mukherjee y Roy, 2016; Zhang y col., 2017), así como producir factores que promueven el crecimiento de las plantas (Nevita y col., 2018). Sin embargo, sería interesante comprobar actividades similares en cepas de este género aisladas de peces. Dado que las librerías de secuenciación de estudio se construyeron utilizando la reconstrucción por amplicón V3-V4 con un tamaño de 460 pb, se hace difícil establecer una filogenética real a nivel de especie.

Se conoce que los miembros del género *Vibrio* son taxones abundantes en la microbiota intestinal de especies de peces marinos (Nayak, 2010; Sullam y col., 2012; Tapia-Paniagua y col., 2019). El análisis LEfSe mostró un incremento significativo en la abundancia de *Vibrio* con respecto al grupo Control en secciones intestinales posteriores de peces alimentados con dieta *Ulva*. Aunque las secuencias no fueron asignadas a nivel de especie en nuestro estudio, Tapia-Paniagua y col. (2019) observaron que las secuencias relacionadas con el género *Vibrio* se asignaron principalmente a *V. scophthalmi* productor de quitinasa. Algunas especies de *Vibrio* son conocidas como patógenas para los peces, pero la presencia de este género es normal en el microbioma de los peces, sin llegar a implicar ningún síntoma de enfermedad (Roeselers y col., 2011; Wanka y col., 2018; Xing y col., 2013). Sería muy interesante saber si los linajes encontrados en este estudio están relacionados con cepas patógenas o no, pero por lo expuesto anteriormente sobre la metodología, es difícil de establecer.

El análisis de la composición de las comunidades microbianas no proporciona información sobre la funcionalidad metabólica de la microbiota. El análisis PICRUSt se ha utilizado para inferir las capacidades funcionales de las comunidades microbianas en varios estudios realizados en peces (Cornejo-Granados y col., 2017; Eichmiller y col., 2016; Huang y col., 2018; Kim y col., 2021; Zhang y col., 2017). Ha permitido inferir diferencias funcionales según las secciones intestinales (Zhang y col., 2017) y cambios funcionales asociados al nivel trófico (Liu y col., 2016). Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que ha abordado el estudio del potencial funcional de las comunidades bacterianas en el tracto intestinal de *S. senegalensis*.

Las funciones inferidas sobre la microbiota no mostraron cambios significativos en las secciones intestinales anteriores de peces alimentados con dietas de Control y Ulva. Sin embargo, junto con las modulaciones en la composición microbiana, se predijeron diferencias en la funcionalidad de la microbiota en el tracto intestinal posterior. En estas secciones, la funcionalidad prevista de la microbiota de los peces que recibieron la dieta Ulva mostró una mayor abundancia de genes implicados en la biodegradación y el metabolismo de xenobióticos (nivel KEGG 2). Debido a la limitación de la harina de pescado para elaborar alimentos acuícolas, está aumentando la inclusión en la dieta de niveles más altos de material vegetal. Esta sustitución en el pienso también introduce sustancias no deseadas, algunas de ellas como xenobióticos (Oliveira y Vasconcelos, 2020; Olsvik y col., 2019; Sanden y col., 2018).

La microbiota intestinal tiene un papel importante no sólo en la digestión de los nutrientes de la dieta, sino también en el metabolismo de los xenobióticos. Por lo que, la actividad de la microbiota intestinal puede resultar en una inactivación de xenobióticos o, por el contrario, conducir a la bioactivación de algunos compuestos, que resulta en una mayor toxicidad (Collins y Patterson, 2020). Por otro lado, se ha informado que la exposición a bifenilos policlorados (PCB) de tipo dioxina provoca alteraciones en microbiota intestinal y en el metabolismo del hospedador, así como inflamación intestinal (Petriello y col., 2018; Sun y col., 2019). Ya se ha documentado la influencia de los xenobióticos en la composición de la microbiota de los peces. En concordancia con los datos de nuestro estudio, se ha observado que ejemplares de *Pimephales promelas* expuestos a benzo(a)pireno mostraban cambios en la composición microbiana y un enriquecimiento en los taxones que degradan los hidrocarburos (DeBofsky y col., 2020).

En el presente estudio, el enriquecimiento de comunidades microbianas capaces de degradar xenobióticos en *S. senegalensis* alimentados con la dieta suplementada con *U. ohnoi* puede considerarse un rasgo positivo. De esta forma, Tarnecki y col., (2019) sugirieron que una mayor capacidad de degradación xenobiótica de la microbiota puede contribuir a una mayor supervivencia del róbalo común (*Centropomus undecimalis*) en larvas tratadas con probióticos. En relación con este último estudio, se ha observado una mejora de la mucosa intestinal en ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con *U. ohnoi* (Vizcaíno y col., 2019).

Por otro lado, se predijo una menor abundancia de genes relacionados con la resistencia a los betalactámicos en la microbiota de los peces alimentados con una dieta suplementada con *U. ohnoi* en comparación con el grupo de la dieta Control. En un estudio reciente, Kokou y col., (2020) han informado de la existencia de un núcleo microbiano en el tracto intestinal de la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) después del tratamiento con antibióticos, aunque estos autores no explicaban si estas poblaciones contenían un mayor número de genes de resistencia a los antibióticos. La creciente resistencia microbiana a los antibióticos representa una preocupación mundial debido a su posible transmisión, no sólo a patógenos animales, sino también humanos. Además, la descarga de desechos de la acuicultura al medio ambiente puede suponer la entrada de bacterias resistentes a los antibióticos y, generar un impacto ambiental. Lo aquí expuesto hace que sea relevante la presencia de genes de resistencia a los antibióticos en la microbiota intestinal de los peces (Kokou y col., 2020). La predicción de una menor presencia de genes de resistencia a los antibióticos en la microbiota de *S. senegalensis* que se alimenta con 5% de *U. ohnoi* podría implicar una menor incidencia en la propagación de la resistencia a los antimicrobianos en entornos acuícolas.

Además, este resultado se acompañó de una mayor abundancia de genes relacionados con la biosíntesis de penicilina y cefalosporina en peces alimentados con la dieta no suplementada con *U. ohnoi*. Se puede considerar que niveles más bajos de síntesis de antibióticos se relacionen con niveles más bajos de resistencia a estos, gracias a un proceso de presión de selección.

En resumen, la inclusión dietética a largo plazo de *U. ohnoi* da como resultado una ligera modulación de la microbiota intestinal de *S. senegalensis*, especialmente en las secciones intestinales posteriores. Además, por primera vez se ha estudiado la influencia de la dieta sobre la funcionalidad intestinal de esta especie piscícola. En la microbiota se ha obtenido la predicción de una mayor abundancia de genes implicados en la biodegradación y el metabolismo de los xenobióticos cuando se utilizó la dieta de *U. ohnoi*. Por el contrario, los porcentajes previstos de genes asociados a la biosíntesis de penicilina y cefalosporina, así como a la resistencia a los betalactámicos, se redujeron tras la alimentación con la dieta Ulva. Los resultados obtenidos representan el punto de partida en el estudio de los efectos de las dietas sobre los cambios potenciales en la funcionalidad de la comunidad microbiana del tracto intestinal de *S. senegalensis*.

Referencias

- Abraham, T. J., Paul, P., Adikesavalu, H., Patra, A., y Banerjee, S. (2016). *Stenotrophomonas maltophilia* as an opportunistic pathogen in cultured African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquaculture*, 450, 168–172. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.015>
- Andrews, S., Krueger, F., Segonds-Pichon, A., Biggins, L., Krueger, C., y Wingett, S. (2010). *FastQC*.
- Araújo, R., Vázquez Calderón, F., Sánchez López, J., Azevedo, I. C., Bruhn, A., Fluch, S., Garcia Tasende, M., Ghaderiardakani, F., Ilmjärv, T., Laurans, M., Mac Monagail, M., Mangini, S., Peteiro, C., Rebours, C., Stefansson, T., y Ullmann, J. (2021). Current status of the algae production industry in europe: an emerging sector of the blue bioeconomy. *Frontiers in Marine Science*, 7, 1247. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.626389>
- Askarian, F., Zhou, Z., Olsen, R. E., Sperstad, S., y Ringø, E. (2012). Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and *in vitro* growth inhibition of four fish pathogens. *Aquaculture*, 326–329, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.016>
- Azaza, M. S., Mensi, F., Ksouri, J., Dhraief, M. N., Brini, B., Abdelmouleh, A., y Kraïem, M. M. (2008). Growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed with diets containing graded levels of green algae ulva meal (*Ulva rigida*) reared in geothermal waters of southern Tunisia. *Journal of Applied Ichthyology*, 24(2), 202–207. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2007.01017.x>
- Bell, T., Newman, J. A., Silverman, B. W., Turner, S. L., y Lilley, A. K. (2005). The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature*, 436(7054), 1157–1160. <https://doi.org/10.1038/nature03891>
- Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., Mills, D. A., y Caporaso, J. G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*, 10(1), 57–59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>
- C De, B., Meena, D. K., Behera, B. K., Das, P., Das Mohapatra, P. K., y Sharma, A. P. (2014). Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(3), 921–971. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9897-0>
- Cerezuela, R., Guardiola, F. A., Meseguer, J., y Esteban, M. Á. (2012). Enrichment of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) diet with microalgae: Effects on the immune system. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(6), 1729–1739. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9670-9>
- Chen, X., Zhao, H., Jiang, G., Tang, J., Xu, Q., Huang, L., Chen, S., Zou, S., Dong, K., y Li, N. (2020). Responses of free-living *Vibrio* community to seasonal environmental variation in a subtropical inland bay. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.610974>
- Collins, S. L., y Patterson, A. D. (2020). The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 10(1), 19–32 <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.12.001>
- Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A. A., Gallardo-Becerra, L., Mendoza-Vargas, A., Sánchez, F., Vichido, R., Brieba, L. G., Viana, M. T., Sotelo-Mundo, R. R., y Ochoa-Leyva, A. (2017). Microbiome of pacific whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between wild, aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. *Scientific Reports*, 7(1), 11783. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11805-w>

- DeBofsky, A., Xie, Y., Grimard, C., Alcaraz, A. J., Brinkmann, M., Hecker, M., y Giesy, J. P. (2020). Differential responses of gut microbiota of male and female fathead minnow (*Pimephales promelas*) to a short-term environmentally-relevant, aqueous exposure to benzo[a]pyrene. *Chemosphere*, 252, 126461. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126461>
- Diler, I., Tekinay, A. A., Güroy, D., Güroy, B. K., y Soyutürk, M. (2007). Effects of *Ulva rigida* on the growth, feed intake and body composition of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Biological Sciences*, 7(2), 305–308. <https://doi.org/10.3923/jbs.2007.305.308>
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., y Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- Eichmiller, J. J., Hamilton, M. J., Staley, C., Sadowsky, M. J., y Sorensen, P. W. (2016). Environment shapes the fecal microbiome of invasive carp species. *Microbiome*, 4(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0190-1>
- Ergün, S., Soyutürk, M., Güroy, B., Güroy, D., y Merrifield, D. (2009). Influence of *Ulva* meal on growth, feed utilization, and body composition of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at two levels of dietary lipid. *Aquaculture International*, 17(4), 355–361. <https://doi.org/10.1007/s10499-008-9207-5>
- Farias, D. R., Simioni, C., Poltronieri, E., Bouzon, Z. L., y Macleod, C. K. (2017). Fine-tuning transmission electron microscopy methods to evaluate the cellular architecture of Ulvacean seaweeds (*Chlorophyta*). *Micron*, 96, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2017.02.003>
- Fernández-Díaz, C., Coste, O., y Malta, E. jan. (2017). Polymer chitosan nanoparticles functionalized with *Ulva ohnoi* extracts boost in vitro ulvan immunostimulant effect in *Solea senegalensis* macrophages. *Algal Research*, 26, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.008>
- Fumanal, M., Di Zeo, D. E., Anguís, V., Fernández-Díaz, C., Alarcón, F. J., Piñera, R., Albaladejo-Riad, N., Esteban, M. A., Moriñigo, M. A., y Balebona, M. C. (2020). Inclusion of dietary *Ulva ohnoi* 5% modulates *Solea senegalensis* immune response during *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 100, 186–197. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.007>
- García-Casal, M. N., Pereira, A. C., Leets, I., Ramírez, J., y Quiroga, M. F. (2007). High iron content and bioavailability in humans from four species of marine algae. *Journal of Nutrition*, 137(12), 2691–2695. <https://doi.org/10.1093/jn/137.12.2691>
- Geng, Y., Wang, K., Chen, D., Huang, X., He, M., y Yin, Z. (2010). *Stenotrophomonas maltophilia*, an emerging opportunist pathogen for cultured channel catfish, *Ictalurus punctatus*, in China. *Aquaculture*, 308(3–4), 132–135. <https://doi.org/10.1016/j.AQUACULTURE.2010.08.032>
- Ghanbari, M., Kneifel, W., y Domig, K. J. (2015). A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, 448, 464–475. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>
- Gonçalves, A. T., y Gallardo-Escárate, C. (2017). Microbiome dynamic modulation through functional diets based on pre- and probiotics (mannan-oligosaccharides and *Saccharomyces cerevisiae*) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Microbiology*, 122(5), 1333–1347. <https://doi.org/10.1111/jam.13437>
- Guerreiro, I., Magalhães, R., Coutinho, F., Couto, A., Sousa, S., Delerue-Matos, C., Domingues, V. F., Oliva-Teles, A., y Peres, H. (2019). Evaluation of the seaweeds *Chondrus crispus* and *Ulva lactuca* as functional ingredients in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 2115–2124. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1708-7>

- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Culture of Marine Invertebrate Animals* (29–60). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3
- Güroy, B., Şahin, I., Mantoğlu, S., y Kayali, S. (2012). Spirulina as a natural carotenoid source on growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail cichlid *Pseudotropheus acei*. *Aquaculture International*, 20(5), 869–878. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9512-x>
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., y Ryan, P. D. (2001). Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 178. https://paleo.carleton.ca/2001_1/past/past.pdf
- He, S., Zhou, Z., Banerjee, G., Huang, L., Ray, A. K., y Ringø, E. (2016). Bacterial diversity in the digestive tracts of four indian air-breathing fish species investigated by PCR based denaturing gradient gel electrophoresis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59, 1–11. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016160332>
- Huang, W., Cheng, Z., Lei, S., Liu, L., Lv, X., Chen, L., Wu, M., Wang, C., Tian, B., y Song, Y. (2018). Community composition, diversity, and metabolism of intestinal microbiota in cultivated European eel (*Anguilla anguilla*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(9), 4143–4157. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8885-9>
- Ingerslev, H. C., von Gersdorff Jørgensen, L., Lenz Strube, M., Larsen, N., Dalsgaard, I., Boye, M., y Madsen, L. (2014). The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. *Aquaculture*, 424–425, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.032>
- Ingerslev, H. C., Strube, M. L., Jørgensen, L. von G., Dalsgaard, I., Boye, M., y Madsen, L. (2014). Diet type dictates the gut microbiota and the immune response against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 40(2), 624–633. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.021>
- Kazemi, M., Abediankenari, A., y Rabieri, R. (2018). Effect of marine macroalgae on growth performance and immune response in rainbow trout fingerlings. *Journal of Fisheries Science and Technology*, 7(1), 9–16. <https://jfst.modares.ac.ir/article-6-12442-en.html>
- Kim, P. S., Shin, N.-R., Lee, J.-B., Kim, M.-S., Whon, T. W., Hyun, D.-W., Yun, J.-H., Jung, M.-J., Kim, J. Y., y Bae, J.-W. (2021). Host habitat is the major determinant of the gut microbiome of fish. *Microbiome*, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S40168-021-01113-X>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., y Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1–e1. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS808>
- Kokou, F., Sasson, G., Mizrahi, I., y Cnaani, A. (2020). Antibiotic effect and microbiome persistence vary along the European seabass gut. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66622-5>
- Korzen, L., Pulidindi, I. N., Israel, A., Abelson, A., y Gedanken, A. (2015). Marine integrated culture of carbohydrate rich *Ulva rigida* for enhanced production of bioethanol. *RSC Advances*, 5(73), 59251–59256. <https://doi.org/10.1039/C5RA09037G>
- Lahaye, M., y Robic, A. (2007). Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, 8(6), 1765–1774. <https://doi.org/10.1021/bm061185q>

- Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepile, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., Beiko, R. G., y Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31(9), 814–821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>
- Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F., y Wang, W. (2016). The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP24340>
- Magnoni, L. J., Martos-Sitcha, J. A., Queiroz, A., Caldach-Giner, J. A., Gonçalves, J. F. M., Rocha, C. M. R., Abreu, H. T., Schrama, J. W., Ozorio, R. O. A., y Pérez-Sánchez, J. (2017). Dietary supplementation of heat-treated *Gracilaria* and *Ulva* seaweeds enhanced acute hypoxia tolerance in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biology Open*, 6(6), 897–908. <https://doi.org/10.1242/bio.024299>
- Martínez-Antequera, F. P., Martos-Sitcha, J. A., Reyna, J. M., y Moyano, F. J. (2021). Evaluation of the inclusion of the green seaweed *Ulva ohnoi* as an ingredient in feeds for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Animals*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/ani11061684>
- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., Desantis, T. Z., Probst, A., Andersen, G. L., Knight, R., y Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME Journal*, 6(3), 610–618. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139>
- McMurdie, P. J., y Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Michel, G., y Czejek, M. (2013). Polysaccharide-degrading enzymes from marine bacteria. In *Marine Enzymes for Biocatalysis: Sources, Biocatalytic Characteristics and Bioprocesses of Marine Enzymes* (pp. 429–464). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781908818355.3.429>
- Morais, S., Aragão, C., Cabrita, E., Conceição, L. E. C., Constenla, M., Costas, B., Dias, J., Duncan, N., Engrola, S., Estevez, A., Gisbert, E., Mañanós, E., Valente, L. M. P., Yúfera, M., y Dinis, M. T. (2016). New developments and biological insights into the farming of *Solea senegalensis* reinforcing its aquaculture potential. *Reviews in Aquaculture*, 8(3), 227–263. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12091>
- Moutinho, S., Linares, F., Rodríguez, J. L., Sousa, V., y Valente, L. M. P. (2018). Inclusion of 10% seaweed meal in diets for juvenile and on-growing life stages of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Applied Phycology*, 30(6), 3589–3601. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1482-6>
- Mukherjee, P., y Roy, P. (2016). Genomic Potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in bioremediation with an assessment of its multifaceted role in our environment. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00967>
- Mustafa, M. G., y Nakagawa, H. (1995). A Review - dietary benefits of algae as an additive in fish feed. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 47(3–4), 155–162. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10003540295/>
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41(11), 1553–1573. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2109.2010.02546.X>

- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Buschmann, A. H., Bush, S. R., Cao, L., Klinger, D. H., Little, D. C., Lubchenco, J., Shumway, S. E., y Troell, M. (2021). A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature* 591 (7851), 551–563. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-6>
- Nevita, T., Sharma, G. D., y Pandey, P. (2018). Composting of rice-residues using lignocellulolytic plant-probiotic *Stenotrophomonas maltophilia*, and its evaluation for growth enhancement of *Oryza sativa* L. *Environmental Sustainability*, 1(2), 185–196. <https://doi.org/10.1007/s42398-018-0017-z>
- Norambuena, F., Hermon, K., Skrzypczyk, V., Emery, J. A., Sharon, Y., Beard, A., y Turchini, G. M. (2015). Algae in fish feed: performances and fatty acid metabolism in juvenile atlantic salmon. *PLOS ONE*, 10(4), e0124042. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0124042>
- Oliveira, M., y Vasconcelos, V. (2020). Occurrence of mycotoxins in fish feed and its effects: A review. *Toxins*. 12(3) 160. <https://doi.org/10.3390/toxins12030160>
- Olsvik, P. A., Larsen, A. K., Berntssen, M. H. G., Goksøyr, A., Karlsen, O. A., Yadetie, F., Sanden, M., y Kristensen, T. (2019). Effects of agricultural pesticides in aquafeeds on wild fish feeding on leftover pellets near fish farms. *Frontiers in Genetics*, 10(SEP), 794. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00794>
- Ortiz, J., Romero, N., Robert, P., Araya, J., Lopez-Hernández, J., Bozzo, C., Navarrete, E., Osorio, A., y Rios, A. (2006). Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chemistry*, 99(1), 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.027>
- Packer, M. A., Harris, G. C., y Adams, S. L. (2016). Food and feed applications of algae. *Green Energy and Technology*, 217–247. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12334-9_12
- Peixoto, M. J., Salas-Leitón, E., Brito, F., Pereira, L. F., Svendsen, J. C., Baptista, T., Pereira, R., Abreu, H., Reis, P. A., Gonçalves, J. F. M., y de Almeida Ozório, R. O. (2017). Effects of dietary *Gracilaria* sp. and *Alaria* sp. supplementation on growth performance, metabolic rates and health in meagre (*Argyrosomus regius*) subjected to pathogen infection. *Journal of Applied Phycology*, 29(1), 433–447. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0917-1>
- Peixoto, M. J., Salas-Leitón, E., Pereira, L. F., Queiroz, A., Magalhães, F., Pereira, R., Abreu, H., Reis, P. A., Gonçalves, J. F. M., y Ozório, R. (2016). Role of dietary seaweed supplementation on growth performance, digestive capacity and immune and stress responsiveness in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Reports*, 3, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.03.005>
- Petriello, M. C., Hoffman, J. B., Vsevolozhskaya, O., Morris, A. J., y Hennig, B. (2018). Dioxin-like PCB 126 increases intestinal inflammation and disrupts gut microbiota and metabolic homeostasis. *Environmental Pollution*, 242, 1022–1032. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.039>
- Ponce, M., Zuasti, E., Anguís, V., y Fernández-Díaz, C. (2020). Effects of the sulfated polysaccharide ulvan from *Ulva ohnoi* on the modulation of the immune response in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish y Shellfish Immunology*, 100, 27–40. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2020.02.054>
- Prabhu, M., Chemodanov, A., Gottlieb, R., Kazir, M., Nahor, O., Gozin, M., Israel, A., Livney, Y. D., y Golberg, A. (2019). Starch from the sea: The green macroalga *Ulva ohnoi* as a potential source for sustainable starch production in the marine biorefinery. *Algal Research*, 37, 215–227. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.007>

- Puello, L., Montoya, O., Castañeda, V., y Moreno, L. (2018). Caracterización de la microbiota presente en el intestino de *Piaractus brachipomus* (Cachamablanca). *Revista de Salud Animal*, 40(2), 1–12. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2018000200002
- Rawls, J. F., Samuel, B. S., y Gordon, J. I. (2004). From The Cover: Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(13), 4596–4601. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400706101>
- Reina, J. C., Torres, M., y Llamas, I. (2019). *Stenotrophomonas maltophilia* AHL-Degrading strains isolated from marine invertebrate microbiota attenuate the virulence of *Pectobacterium carotovorum* and *Vibrio coralliilyticus*. *Marine Biotechnology*, 21(2), 276–290. <https://doi.org/10.1007/s10126-019-09879-w>
- Reisky, L., Prechoux, A., Zühlke, M.-K., Bäumgen, M., Robb, C., Gerlach, N., Roret, T., Stanetty, C., Larocque, R., y Michel, G. (2019). A marine bacterial enzymatic cascade degrades the algal polysaccharide ulvan. *Nature Chemical Biology*, 15(8), 803–812. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0311-9>
- Ringø, E., Zhou, Z., Vecino, J. L. G., Wadsworth, S., Romero, J., Kroghdahl, Å., Olsen, R. E., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Owen, M., Lauzon, H. L., Martinsen, L. L., De Schryver, P., Bossier, P., Sperstad, S., y Merrifield, D. L. (2016). Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquaculture Nutrition*, 22(2), 219–282. <https://doi.org/10.1111/anu.12346>
- Roeselers, G., Mittge, E. K., Stephens, W. Z., Parichy, D. M., Cavanaugh, C. M., Guillemin, K., y Rawls, J. F. (2011). Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME Journal*, 5(10), 1595–1608. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.38>
- Romero, J., Ringø, E., y Merrifield, D. L. (2014). The Gut Microbiota of Fish. *Aquaculture Nutrition* 75–100. John Wiley y Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118897263.ch4>
- Sáez, M. I., Martínez, T., y Alarcón, J. (2013). Effect of dietary inclusion of seaweeds on intestinal proteolytic activity of juvenile sea bream, *Sparus aurata*. *International Aquafeed*, 3(3), 38–41.
- Salinas, I., Díaz-Rosales, P., Cuesta, A., Meseguer, J., Chabrillón, M., Moriño, M. Á., y Esteban, M. Á. (2006). Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 111(3–4), 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.020>
- Sanden, M., Olsvik, P. A., Sjøteland, L., Rasinger, J. D., Rosenlund, G., Garlito, B., Ibáñez, M., y Berntssen, M. H. G. (2018). Dietary pesticide chlorpyrifos-methyl affects arachidonic acid metabolism including phospholipid remodeling in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 484, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.033>
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., y Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., y Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6). <https://doi.org/10.1186/GB-2011-12-6-R60>

- Semova, I., Carten, J. D., Stombaugh, J., Mackey, L. C., Knight, R., Farber, S. A., y Rawls, J. F. (2012). Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. *Cell Host y Microbe*, 12(3), 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.003>
- Silva, D. M., Valente, L. M. P., Sousa-Pinto, I., Pereira, R., Pires, M. A., Seixas, F., y Rema, P. (2015). Evaluation of IMTA-produced seaweeds (*Gracilaria*, *Porphyra*, and *Ulva*) as dietary ingredients in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., juveniles. Effects on growth performance and gut histology. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1671–1680. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0453-9>
- Sullam, K. E., Essinger, S. D., Lozupone, C. A., O'Connor, M. P., Rosen, G. L., Knight, R., Kilham, S. S., y Russell, J. A. (2012). Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Molecular Ecology*, 21(13), 3363–3378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05552.x>
- Sun, Y., Tang, L., Liu, Y., Hu, C., Zhou, B., Lam, P. K. S., Lam, J. C. W., y Chen, L. (2019). Activation of aryl hydrocarbon receptor by dioxin directly shifts gut microbiota in zebrafish. *Environmental Pollution*, 255, 113357. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2019.113357>
- Tapia-Paniagua, S., Lobo, C., Moreno-Ventas, X., de la Banda, I. G., Moriñigo, M. A., y Balebona, M. C. (2014). Probiotic supplementation influences the diversity of the intestinal microbiota during early stages of farmed Senegalese Sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Marine Biotechnology*, 16(6), 716–728. <https://doi.org/10.1007/s10126-014-9588-6>
- Tapia-Paniagua, Silvana T., Fumanal, M., Anguís, V., Fernández-Díaz, C., Alarcón, F. J., Moriñigo, M. A., y Balebona, M. C. (2019). Modulation of intestinal microbiota in *Solea senegalensis* fed low dietary level of *Ulva ohnoi*. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00171>
- Tapia-Paniagua, Silvana Teresa, Reyes-Becerril, M., Ascencio-Valle, F., Esteban, M. Á., Clavijo, E., Balebona, M. C., y Moriñigo, M. A. (2011). Modulation of the intestinal microbiota and immune system of farmed *Sparus aurata* by the administration of the yeast *Debaryomyces hansenii* L2 in conjunction with inulin. *Journal of Aquaculture Research y Development*, s1(SPEC. ISSUE 1). <https://doi.org/10.4172/2155-9546.S1-012>
- Tarnecki, A. M., Brennan, N. P., Schloesser, R. W., y Rhody, N. R. (2019). Shifts in the skin-associated microbiota of hatchery-reared common snook centropomus undecimalis during acclimation to the wild. *Microbial Ecology*, 77(3), 770–781. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1252-7>
- Torabi Delshad, S., Soltanian, S., Sharifiyazdi, H., Haghkhah, M., y Bossier, P. (2018). Identification of N -acyl homoserine lactone-degrading bacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Microbiology*, 125(2), 356–369. <https://doi.org/10.1111/jam.13891>
- Toro, F., Alarcón, J., Márquez, S., Capella, J., Bahamonde, P., Esperón, F., Moreno-Switt, A., y Castro-Nallar, E. (2021). Composition and structure of the skin microbiota of rorquals off the Eastern South Pacific. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(5). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab050>
- Valente, L.M.P., Gouveia, A., Rema, P., Matos, J., Gomes, E. F., y Pinto, I. S. (2006). Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 252(1), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.052>

- Valente, Luísa M P, Araújo, M., Batista, S., Peixoto, M. J., Sousa-Pinto, I., Brotas, V., Cunha, L. M., y Rema, P. (2016). Carotenoid deposition, flesh quality and immunological response of Nile tilapia fed increasing levels of IMTA-cultivated *Ulva* sp. *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 691–701. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0590-9>
- Vizcaíno, A. J., Fumanal, M., Sáez, M. I., Martínez, T. F., Moriñigo, M. A., Fernández-Díaz, C., Anguis, V., Balebona, M. C., y Alarcón, F. J. (2019). Evaluation of *Ulva ohnoi* as functional dietary ingredient in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Effects on the structure and functionality of the intestinal mucosa. *Algal Research*, 42, 101608. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2019.101608>
- Vizcaíno, Antonio Jesús, Mendes, S. I., Varela, J. L., Ruiz-Jarabo, I., Rico, R., Figueroa, F. L., Abdala, R., Moriñigo, M. Á., Mancera, J. M., y Alarcón, F. J. (2016). Growth, tissue metabolites and digestive functionality in *Sparus aurata* juveniles fed different levels of macroalgae, *Gracilaria cornea* and *Ulva rigida*. *Aquaculture Research*, 47(10), 3224–3238. <https://doi.org/10.1111/are.12774>
- Wang, C., Liu, Y., Sun, G., Li, X., y Liu, Z. (2019). Growth, immune response, antioxidant capability, and disease resistance of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed *Bacillus velezensis* V4 and *Rhodotorula mucilaginosa* compound. *Aquaculture*, 500, 65–74. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.09.052>
- Wang, L., Zhao, X., Xu, H., Bao, X., Liu, X., Chang, Y., y Ding, J. (2018). Characterization of the bacterial community in different parts of the gut of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and its variation during gut regeneration. *Aquaculture Research*, 49(5), 1987–1996. <https://doi.org/10.1111/are.13654>
- Wanka, K. M., Damerau, T., Costas, B., Krueger, A., Schulz, C., y Wuertz, S. (2018). Isolation and characterization of native probiotics for fish farming. *BMC Microbiology*, 18. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1260-2>
- Wassef, E.A., El-Sayed, A. F. M., Kandeel, K. M., y Sakr, E. M. (2005). Evaluation of *Pterocladia* (Rhodophyta) and *Ulva* (Chlorophyta) meals as additives to gilthead seabream *Sparus aurata* diets. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 31, 321–332. <https://www.researchgate.net/publication/281016388>
- Wassef, Elham A., El-Sayed, A.-F. M., y Sakr, E. M. (2013). *Pterocladia* (Rhodophyta) and *Ulva* (Chlorophyta) as feed supplements for European seabass, *Dicentrarchus labrax* L., fry. *Journal of Applied Phycology*, 25(5), 1369–1376. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9995-5>
- Webster, T. M. U., Rodriguez-Barreto, D., Castaldo, G., Gough, P., Consuegra, S., y Leaniz, C. G. de. (2020). Environmental plasticity and colonisation history in the Atlantic salmon microbiome: A translocation experiment. *Molecular Ecology*, 29(5), 886–898. <https://doi.org/10.1111/MEC.15369>
- Wells, M. L., Potin, P., Craigie, J. S., Raven, J. A., Merchant, S. S., Helliwell, K. E., Smith, A. G., Camire, M. E., y Brawley, S. H. (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology*, 29(2), 949–982. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0974-5>
- Xing, M., Hou, Z., Yuan, J., Liu, Y., Qu, Y., y Liu, B. (2013). Taxonomic and functional metagenomic profiling of gastrointestinal tract microbiome of the farmed adult turbot (*Scophthalmus maximus*). *FEMS Microbiology Ecology*, 86(3), 432–443. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12174>
- Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M., y Takriff, M. S. (2014). An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 2014 21:1, 21(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/2241-5793-21-6>

- Ye, L., Amberg, J., Chapman, D., Gaikowski, M., y Liu, W. T. (2014). Fish gut microbiota analysis differentiates physiology and behavior of invasive Asian carp and indigenous American fish. *ISME Journal*, 8(3), 541–551. <https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2013.181>
- Yeganeh, S., y Adel, M. (2019). Effects of dietary algae (*Sargassum ilicifolium*) as immunomodulator and growth promoter of juvenile great sturgeon (*Huso huso*, Linnaeus 1758). *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 2093–2102. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1673-1>
- Yildirim, Ö., Ergün, S., Yaman, S., y Türker, A. (2009). Rasyonlarda Yem Katkı Maddesi Olarak İki Deniz Yosununun (*Ulva lactuca*, *Enteromorpha linza*) Gökkuşluğu Alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) Büyüme Performansı, Yem Değerlendirme ve Vücut Kompozisyonu Üzerine Etkileri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(3), 455–460. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2009.042-a>
- Zhang, Q., Saleem, M., y Wang, C. (2017). Probiotic strain *Stenotrophomonas acidaminiphila* BJ1 degrades and reduces chlorothalonil toxicity to soil enzymes, microbial communities and plant roots. *AMB Express*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/S13568-017-0530-Y>
- Zhu, D., Wen, X., Xuan, X., Li, S., y Li, Y. (2016). The green alga *Ulva lactuca* as a potential ingredient in diets for juvenile white spotted snapper *Lutjanus stellatus* Akazaki. *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 703–711. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0545-1>

Material suplementario

El material suplementario de este capítulo puede descargarse para una mejor visualización en:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.801744/full#supplementary-material>

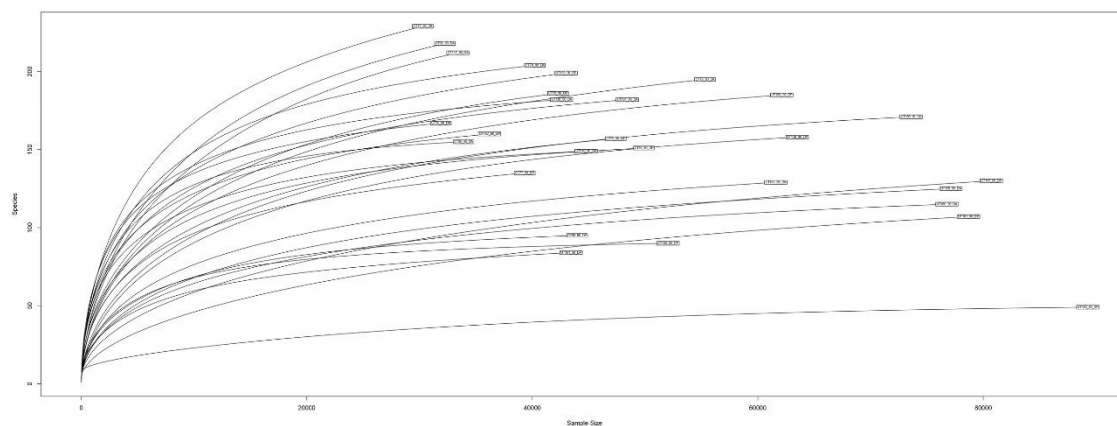


Figura Suplementaria 1. Curvas de rarefacción por muestras de microbiota intestinal de *S. senegalensis*.

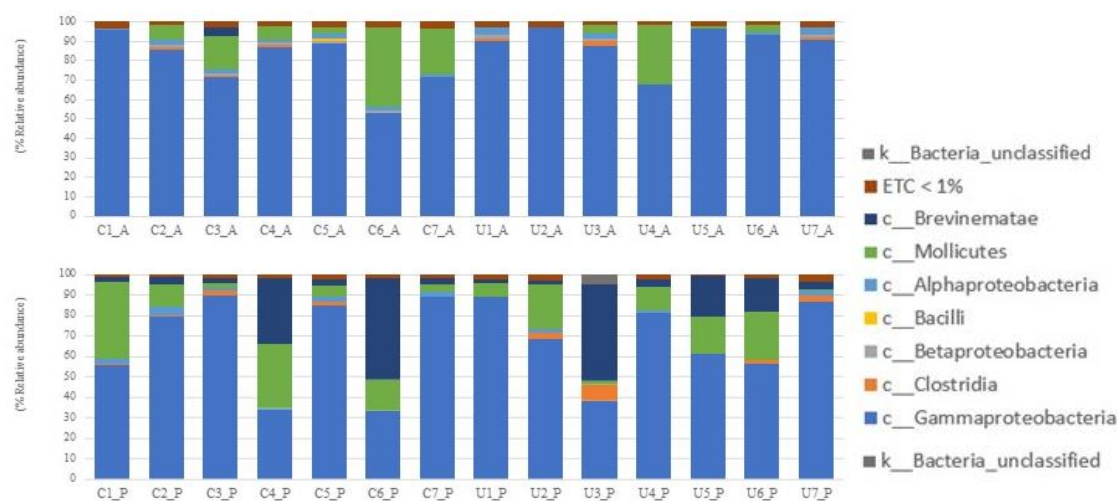


Figura Suplementaria 2. Composición relativa de las muestras de la microbiota del tracto digestivo de *S. senegalensis* a nivel de clase, de los animales alimentados con la dieta control (C) y suplementada con *U. ohnoi* (U) por 90 días. (A) representa la sección anterior (P) sección posterior, 1-7 el número de la réplica. ETC indica las clases cuya abundancia relativa sumaban < 1%.

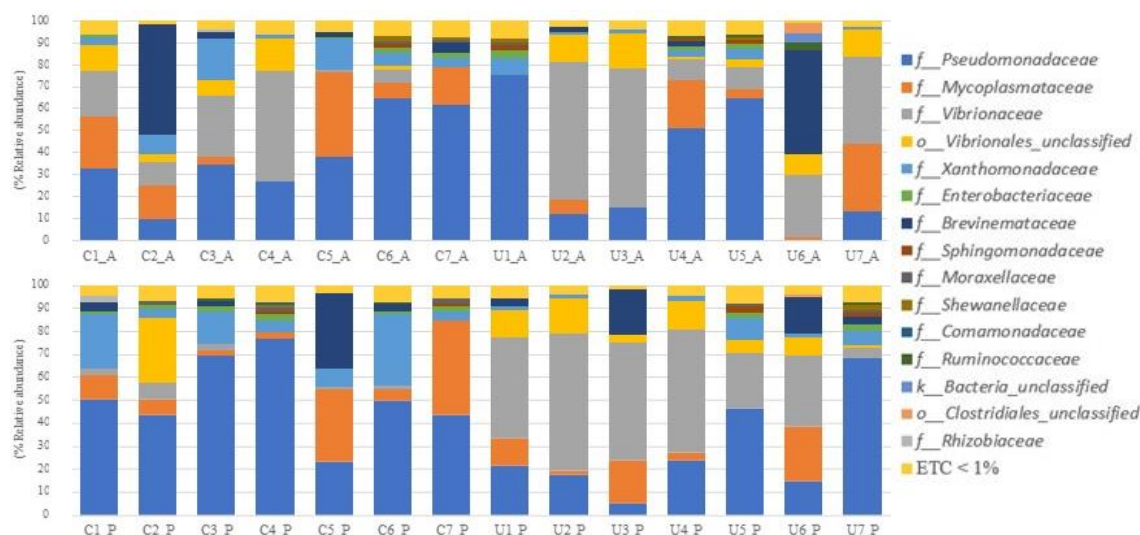


Figura Suplementaria 3. Composición relativa de las muestras de la microbiota del tracto digestivo de *S. senegalensis* a nivel de familia, de los animales alimentados con la dieta control (C) y suplementada con *U. ohnoi* (U) por 90 días. (A) representa la sección anterior (P) sección posterior, 1-7 el número de la réplica. ETC indica las familias cuya abundancia relativa sumaban < 1%.

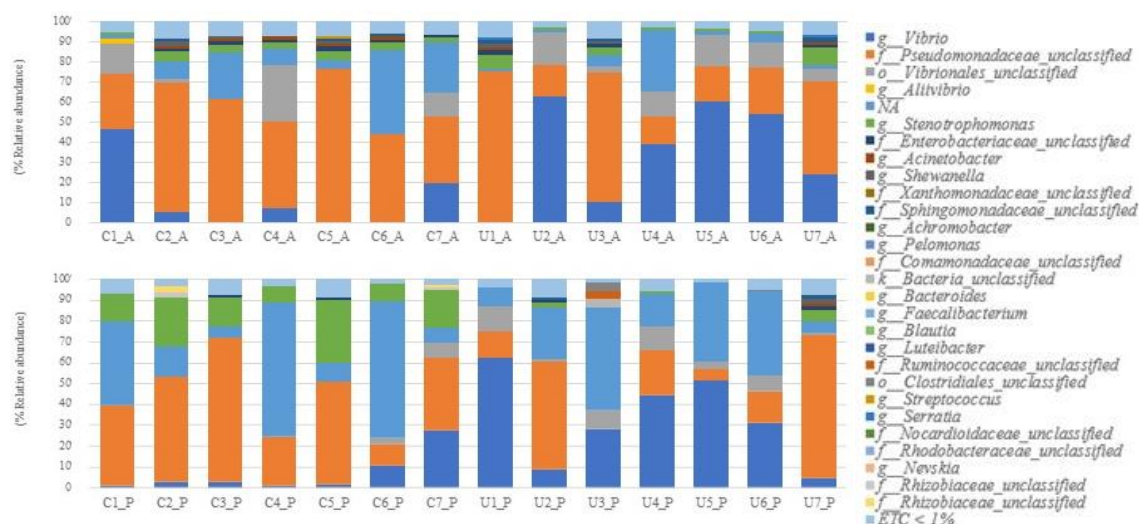


Figura Suplementaria 4. Composición relativa de las muestras de la microbiota del tracto digestivo de *S. senegalensis* a nivel de género, de los animales alimentados con la dieta control (C) y suplementada con *U. ohnoi* (U) por 90 días. (A) representa la sección anterior (P) sección posterior, 1-7 el número de la réplica. ETC indica los géneros cuya abundancia relativa sumaban < 1%.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Capítulo 5



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Evaluación del efecto de la aplicación de *Shewanella putrefaciens* Pdp11, como paraprobiótico, sobre la microbiota y la respuesta transcriptómica intestinal de ejemplares de *Solea senegalensis*

Resumen

Los probióticos aportan beneficios para la salud del hospedador y su viabilidad se considera un factor que puede modular sus efectos. La seguridad, estabilidad y estandarización de las células probióticas vivas han suscitado preocupación. En este contexto, crece el interés por explorar alternativas que consisten en células inactivadas como los paraprobióticos. El objetivo de este estudio fue explorar los efectos potenciales de la suplementación dietética con células sonicadas de la cepa SpPdp11, un microorganismo probiótico, sobre el estado intestinal de juveniles de *Solea senegalensis*. Para ello, se alimentó a ejemplares de *S. senegalensis* (105 ± 5 g) con una dieta suplementada con el preparado de células bacterianas sonicadas (10^9 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml; grupo experimental PDP11) o con una dieta de control (CTRL) durante 45 días.

Los resultados histológicos indicaron un estado más saludable, con signos de propiedades antiinflamatorias en los peces que recibieron la dieta suplementada con paraprobióticos en comparación con los ejemplares alimentados con la dieta de control. De acuerdo con esta observación histológica, la menor transcripción de genes implicados en la respuesta inflamatoria, sugieren efectos antiinflamatorios. Además, se demostró una modulación de la microbiota intestinal, con una reducción significativa de la abundancia del filo *Proteobacteria*, lo que podría estar relacionado con el menor estado inflamatorio detectado en el intestino de los ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con la dieta paraprobiótica. Los resultados obtenidos confirmaron el potencial del preparado celular bacteriano SpPdp11 sonificado para mejorar el estado intestinal de los juveniles de lenguado senegalés.

1. Introducción

Para optimizar el crecimiento y garantizar la salud de los teleósteos en acuicultura, es esencial mantener la estabilidad en su intestino (Zhang y col., 2020). La barrera intestinal de estos animales, compuesta por la mucosa intestinal, que consta a su vez del epitelio, la lámina propia y la muscular de la mucosa, separa los contenidos del lumen del resto de células del organismo (Benjamin y col., 2013). Un sistema gastrointestinal saludable permite una digestión eficiente, una buena absorción de nutrientes y aumenta la resistencia a enfermedades (Zhang y col., 2020), sin embargo, las alteraciones de la barrera intestinal desencadenan trastornos inflamatorios (Yin y col., 2020, Zhao y Pack, 2017, Zhang y col., 2013), y cambios en la permeabilidad de la mucosa intestinal que facilitan la invasión de bacterias patógenas (Mosberian-Tanha y col. 2016).

La dieta, ejerce una influencia directa en la salud del tracto intestinal y puede asociarse con alteraciones de la microbiota intestinal en peces de piscifactoría (Martin y Król, 2017; Yukgehnash y col. 2020). Mantener un equilibrio de esta comunidad microbiana es esencial para el estado nutricional e inmunitario del hospedador (Belkaid y Hand, 2014; Levy y col., 2017), por lo que cualquier alteración puede impactar en la fisiología del organismo (Rombout y col., 2010; Standen y col., 2015). Una disbiosis en la microbiota conduce a la producción de metabolitos perjudiciales que afectan negativamente a la salud del hospedador, causando trastornos inmunitarios y aumentando la susceptibilidad a las enfermedades (Foucault y col., 2022; Mougin y Joyce, 2023). En este contexto, los probióticos, definidos como células microbianas vivas (Merrifield y col., 2010), son factores dietéticos capaces de regular la composición de la microbiota intestinal, promoviendo un equilibrio saludable y contribuyendo así al bienestar general del hospedador (Abul y col., 2018; Gupta y col., 2019; Li y col., 2022).

La viabilidad de los probióticos se considera un factor crucial que puede regular sus efectos (Muñoz-Atienza y col., 2015; Sarkar, 2018). Aunque las células probióticas vivas ofrecen numerosos beneficios, han surgido preocupaciones con respecto a su seguridad, estabilidad y estandarización (Choudhury y Kamilya, 2018). En vista de ello, ha aumentado el interés por explorar alternativas. Las células microbianas no viables, por ejemplo, ofrecen ventajas como una menor interacción con los componentes de los alimentos; un procesamiento simplificado que permite la adición antes del tratamiento térmico (Li y col., 2022), una mayor seguridad al reducir el riesgo de infección, las respuestas inflamatorias y la

translocación microbiana, así como un fácil almacenamiento y transporte (De Almada y col., 2016). Los paraprobióticos, definidos como “células microbianas no viables (intactas o rotas), o extractos celulares crudos (es decir, con composición química compleja), que, administrados (por vía oral o tópica) en cantidades adecuadas, confieren un beneficio al consumidor humano o animal” (Shripada y col., 2019), han surgido como una opción interesante. Estos subproductos, originados a partir de microorganismos vivos, pueden proporcionar beneficios como los probióticos, ofreciendo la ventaja añadida de una forma de consumo más segura (Taverniti y Guglielmetti, 2011). Los microorganismos probióticos no viables han demostrado la capacidad de ejercer efectos beneficiosos, como la estimulación del sistema inmunitario del hospedador (De Almada y col., 2016; Taverniti y Guglielmetti, 2011) o la modulación del entorno intestinal (Duc y col., 2020; Wu y col., 2020).

Mediante la sonicación se utilizan ondas ultrasónicas (>16 kHz) para inactivar las bacterias mediante la interrupción de las interacciones intermoleculares (Gibson y col., 2009). Actualmente, el ultrasonido de alta intensidad (HIUS) ha sido objeto de intensos estudios para el procesamiento de alimentos, sobre todo para alimentos líquidos, en aplicaciones significativas como la inactivación microbiana (Toledo-Hijo y col., 2023). Algunos autores han reportado los efectos de células probióticas inactivadas como el caso de *Bacillus subtilis* AB1, que fue eficaz en el control de infecciones causadas por el patógeno de peces *Aeromonas* sp. en trucha arcoíris (Newaj-Fyzul y col., 2007); células sonicadas de *Lactobacillus plantarum* mejoraron la capacidad antiestrés de *Litopenaeus vannamei* (Zheng y col., 2017); o de forma similar, en cepas de *Enterococcus avium* se alcanzaron mayores tasas de crecimiento y de supervivencia en tilapia, tras una infección experimental con *Streptococcus agalactiae* (Wang y col., 2019). Sin embargo, hay un número limitado de estudios centrados en la inactivación de microorganismos probióticos a través de la sonicación, y el uso de esta técnica en probióticos para peces sigue siendo relativamente inexplorado, lo que enfatiza la necesidad de una mayor investigación en esta área.

Nuestro grupo de investigación ha participado activamente en el estudio del potencial probiótico de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11), una bacteria gran negativa aislada de la piel sana de *S. aurata* (Díaz-Rosales y col., 2009). En su forma de célula viva, SpPdp11 ha demostrado numerosos beneficios, incluyendo la promoción del crecimiento, la mejora de la eficiencia de la utilización del alimento, la estimulación del sistema inmunitario y la mejora de

la funcionalidad intestinal en varias especies de peces (Cordero y col., 2015; Díaz-Rosales y col., 2009; García de La Banda y col., 2010; Lobo y col., 2014; Sáenz De Rodrigáñez y col., 2009). Reconociendo los desafíos potenciales asociados con las células probióticas vivas, nuestro enfoque se extiende a explorar sus efectos como paraprobiótico. Recientemente, Domínguez-Maqueda y col., (2021) evaluaron las consecuencias sobre la microbiota intestinal y la transcripción de genes relacionados con el sistema inmunitario, de incluir en la dieta de *S. senegalensis* células de SpPdp11 inactivadas por calor, observando ligeros cambios en la respuesta inmunitaria intestinal en comparación con los peces que recibieron la dieta suplementada con células probióticas viables. Sin embargo, siendo la sonicación un proceso diferente de inactivación, su aplicación al probiótico Spdp11 debe ser estudiada.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio es investigar y evaluar los efectos potenciales de las células SpPdp11 sonicadas incorporadas a la dieta sobre el estado intestinal de los ejemplares de *S. senegalensis*. Este enfoque muestra potencial como opción viable para introducir microorganismos no vivos en la acuicultura, aportando beneficios al consumidor.

2. Material y métodos

2.1. Cultivo del microorganismo probiótico y sonicación

La cepa probiótica SpPdp11 se cultivó en caldo de soja tripticasa (TSB, Sigma) con un suplemento de NaCl al 1,5% (TSBs). El cultivo se incubó a 23 °C con agitación orbital hasta que entró en la fase de crecimiento exponencial (DO = 1, a 600 nm). Al alcanzar esta fase, las células se almacenaron tras centrifugación a $3\,000 \times g$, 10 min, 4 °C y un ajuste equivalente a 10^9 UFC/mL en solución salina tamponada con fosfato (PBS, Sigma) .

Posteriormente, la suspensión bacteriana se sometió a sonicación utilizando el procesador ultrasónico UP200S (Hielscher). Los parámetros de sonicación incluyeron de 4 pulsos de 30 s cada uno, con una amplitud de 35 μm y un ajuste de ciclo de 1. A continuación, el extracto de SpPdp11 fue centrifugado a $3\,000 \times g$ durante 5 min a 4 °C, obteniendo un contenido de proteína total de 0,4 $\mu g/\mu L$ cuantificado con el fluorómetro Qubit (ThermoFisher). Se realizó una siembra en placa para corroborar que no existían células vivas y el extracto final de SpPdp11 se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

2.2. Preparación del pienso, diseño experimental y recogida de muestras

En este ensayo se utilizaron dos dietas. La dieta comercial con pellets Europa L3 (57% de proteína total, 16% de grasa total, 10% de cenizas y 0,10% celulosa; Skretting, Burgos, España) se utilizó como dieta control (CTRL). La dieta experimental se preparó con los preparados de células bacterianas sonicadas pulverizadas en el pienso control para alcanzar una dosis equivalente a 10^9 UFC/ml de pienso (PDP11). La dieta CTRL fue pulverizada con la misma cantidad de PBS sin bacterias sonicadas que la dieta PDP11. Las dietas experimentales se prepararon cada dos semanas y se almacenaron a 4 °C antes de su uso diario.

Los ejemplares de *S. senegalensis* (105 ± 5 g) se cultivaron en las instalaciones del Instituto Español de Oceanografía de Santander bajo el mantenimiento y la manipulación de técnicos autorizados. Se distribuyeron aleatoriamente diez peces en tanques de 200L con un flujo continuo de agua de mar ($17,1 \pm 0,7$ °C). Tras un periodo de aclimatación de dos semanas se inició la fase experimental. Para el experimento, se seleccionaron tres réplicas por duplicado (dos tanques) (N = 6) para cada régimen de alimentación. A continuación, se alimentó a los juveniles de lenguado senegalés con la dieta CTRL o PDP11 durante 45 días, ofreciéndoles el alimento dos veces al día. Para ajustar las cantidades diarias de alimento al 2% de la biomasa total, cada dos semanas se pesaron los ejemplares, procediéndose para ello a su anestesia con aceite de clavo (80 ppm). Se controló sistemáticamente la supervivencia de los peces durante todo el periodo experimental.

Posteriormente, se sacrificaron seis peces por tratamiento utilizando una sobredosis de aceite de clavo. A continuación, se diseccionaron meticulosamente intestinos enteros en condiciones estériles, y se dividieron segmentos (0,5 cm) de las regiones anterior (proximal al estómago) y posterior (prerrectal) del intestino, que se conservaron a -80°C para el posterior análisis de la expresión génica y la microbiota intestinal. También se recogieron porciones de 1 cm de longitud del intestino anterior y posterior para su posterior examen con microscopio óptico (N = 6).

2.3. Observaciones histológicas

Para su examen al microscopio óptico, las muestras de tejido intestinal se fijaron en formol tamponado con fosfato (4% v/v, pH 7,2) durante 24 h, se deshidrataron a continuación y se sumergieron en parafina según las técnicas histológicas habituales (Bancroft, 2008). Las muestras se dividieron en secciones, y una vez cortadas en secciones transversales de 5µm, se tiñeron y se observaron al microscopio óptico (OLYMPUS IX51) con aumentos de x40, x100 y x400, equipado con una cámara digital CC 12 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Muenster, Alemania). Las imágenes se analizaron utilizando el programa específico ImageJ versión 1.45 (National Institutes of Health Image software, Bethesda, MD) (García-Márquez y col., 2022). Se analizaron los parámetros de longitud y diámetro de los pliegues mucosos, la altura de las vellosidades y de los enterocitos totales, el diámetro de las vellosidades y el grosor de la lámina propia y de las capas submucosa, muscular y serosa (30 mediciones independientes al azar para cada 6 especímenes por tratamiento y parte del intestino).

Los resultados del análisis histológico se presentan como media $\pm$ DE (N = 6 por tratamiento). La distribución normal de todos los datos se examinó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y la homogeneidad de las varianzas se comprobó con la prueba de Levene. Cuando fue necesario, se aplicó una transformación arcoseno. Las diferencias de tratamiento se comprobaron mediante la prueba *t* de Student. Se consideró significativo un nivel de significación de $p < 0,05$. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS Statistics (SPSS Inc, IBM Company, NY, EE.UU.).

2.4. Extracción, evaluación de la calidad y secuenciación del ARN

El ARN total (N = 6 por sección y tratamiento) de muestras de intestino de dorada anterior y posterior se llevó a cabo con la metodología TRIsure™ (Qiagen, Alemania), y el ARN resuspendido en agua se almacenó a -80 °C para su posterior análisis. La cuantificación, la evaluación de la integridad y la secuenciación de librerías de ARN total siguieron el protocolo de Cerezo y col., 2023.

Las lecturas brutas se procesaron para eliminar los adaptadores de secuenciación, las regiones poli-N y las lecturas de baja calidad mediante el programa Fastp (Chen y col., 2018). A continuación, se calcularon el Q20, el Q30 y el contenido de

GC de los datos limpios, y todos los análisis posteriores se basaron en estos datos limpios y de alta calidad.

Las lecturas pareadas limpias se mapearon en el transcriptoma de referencia de *S. senegalensis* (ensamblaje del genoma IFAPA_SoseM_1, obtenido de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_019176455.1/GCF_019176455.1 (subido el 30 de septiembre de 2021) utilizando el programa Bowtie2 (Langmead y Salzberg, 2012). Los recuentos de transcritos se generaron utilizando el programa sam2counts. El análisis de expresión diferencial se implementó utilizando el paquete *DESeq2* en R. Los transcritos expresados diferencialmente (DEG) se definieron como aquellos con un valor de cambio absoluto logarítmico de 2 ($|\log_2FC| \geq 2$) y p corregido $< 0,05$ en todas las condiciones de estudio. El análisis de enriquecimiento significativo entre las rutas KEGG, se determinó con un valor ajustado p Benjamini-Hochberg $\leq 0,05$ utilizando la librería de R *clusterprofiler*. Las rutas enriquecidas se visualizaron mediante la función *ridgeplot* del paquete R *ggridge*.

2.5. Extracción, evaluación de la calidad y secuenciación del gen ADNr 16S

Las muestras de intestino (N = 6 por condición y sección) almacenadas a -80°C se descongelaron gradualmente en hielo. El contenido del moco se extrajo presionando suavemente hacia los extremos con un objeto estéril. Tras la homogeneización, se utilizaron 50 mg de cada muestra de moco para la extracción de ADN. La extracción de ADN siguió un protocolo basado en la precipitación salina con pequeñas modificaciones (Martínez y col., 1998). La concentración de ADN se midió fluorométricamente utilizando el QubitTM dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), mientras que para evaluar la pureza, calidad e integridad del ADN se emplearon métodos espectrofotométricos y electroforéticos.

Posteriormente, se secuenció el gen ADNr 16S para todas las muestras en la plataforma Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.) utilizando secuenciación de 2×250 pb de extremos pareados en el servicio de ultrasecuenciación de Novogene Europe (Cambridge, Reino Unido). Se siguió el protocolo para la preparación de la librería de secuenciación metagenómica 16S, centrándose en las regiones hipervariables V3-V4 del gen ADNr 16S. La secuenciación se realizó utilizando los cebadores 341F

(CCTAYGGGRBGCASCAG) y 806R (GGACTACNNGGGTATCTAAT) (Klindworth y col., 2013).

Todas las lecturas de Illumina se analizaron con el programa FastQC (versión 0.11.4) y la puntuación Q30 se mantuvo $\geq 92\%$ en todas las muestras. El procesamiento posterior de los datos incluyó el recorte, el análisis 16S y la visualización mediante un flujo de trabajo basado en el paquete *DADA2* de R siguiendo el procedimiento descrito por Cerezo y col., (2023). La diversidad alfa se estimó mediante los índices de Observado, Shannon y Simpson y la diversidad beta se mostró con la representación NMDS. Los análisis estadísticos entre índices de diversidad se realizaron mediante ANOVA de dos vías ($p < 0,05$). La abundancia diferencial de taxones se determinó mediante la estadística LefSE (puntuación LDA > 2).

PICRUST2 (v. 2.5, configuración por defecto), se empleó en el análisis para predecir la funcionalidad del metagenoma, basado en la abundancia de las ASV. Las diferencias en los recuentos de funciones inferidas se calcularon utilizando la herramienta de análisis ALDEx2 (Gloor, 2015), tal y como se recomienda en el tutorial de PICRUST2 ([https://github.com/picrust/picrust2/wiki/PICRUST2-Tutorial-\(v2.4.2\)](https://github.com/picrust/picrust2/wiki/PICRUST2-Tutorial-(v2.4.2))). En concreto, se utilizó una prueba *t* de Welch de 0,05 del valor *p* corregido de Benjamini-Hochberg para identificar los genes predichos diferencialmente abundantes. El análisis de enriquecimiento de genes se realizó utilizando la base de datos KEGG y el paquete de R *clusterprofiler*, valor *p* ajustado por Benjamini-Hochberg (BH) (*p* ajustado $< 0,05$). Las vías enriquecidas se visualizaron mediante los paquetes de R *pathview* y *ggplot2*.

2.6. Declaración del comité de ética

Todos los procedimientos relacionados con los peces siguieron rigurosamente las directrices marcadas por la Unión Europea (2010/63/UE) y la legislación española (RD 1201/2005 y ley 32/2007) relativas al uso ético de los animales de laboratorio. El experimento *in vivo* se realizó en el Instituto Español de Oceanografía de Santander (CEBA-IEO) bajo procedimientos aprobados por el Comité Ético de Bienestar Animal.

2.7. Declaración de disponibilidad de datos

Los archivos Fastq sin procesar están actualmente disponibles en el National Centre for Biotechnology Information (NCBI), bajo los respectivos bioproyectos

PRJNA1074949 (para los datos de ARN de *S. senegalensis*) y PRJNA1075492 (para las secuencias ribosómicas bacterianas 16S).

3. Resultados

3.1. Examen histológico de la respuesta *in vivo*

En los cortes histológicos de las secciones anterior y posterior del intestino preparados para evaluar los efectos de la dieta en estos tejidos e inferir el estado de salud general de los especímenes se observó que ambos segmentos del intestino presentaban un aspecto normal, sin alteraciones histológicas. La estructura y organización normales de las vellosidades intestinales, a menudo denominadas “dedos en guante”, permanecieron intactas. Los núcleos de los enterocitos se apreciaban sistemáticamente alineados en la región basal de las células, mientras que la parte apical reveló un “borde en cepillo” intacto y continuo, en la capa superficial de la mucosa intestinal. Estas observaciones confirman que la mucosa intestinal mantiene una estructura normal y aparentemente sana en todos los animales (Figura 1A y 1B).

Además, se realizaron mediciones morfométricas en las imágenes histológicas para proporcionar una comprensión más completa de la estructura intestinal. La Tabla 1 resume los resultados obtenidos para las regiones anterior y posterior del intestino. En cuanto a la altura de las vellosidades intestinales (VH), no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, ni entre las regiones intestinales. Sin embargo, se observó un aumento significativo del diámetro de las vellosidades (VD) en el grupo PDP11 en comparación con el grupo CTRL en el intestino anterior.

El grosor de la lámina propia (LP), un parámetro empleado para evaluar los procesos inflamatorios dentro del tejido conectivo subyacente de la mucosa intestinal, mostró una reducción estadísticamente significativa en los peces alimentados con dieta suplementada con el paraprobótico. Además, la altura de los enterocitos (EH) fue significativamente menor en el grupo PDP11 (Tabla 1).

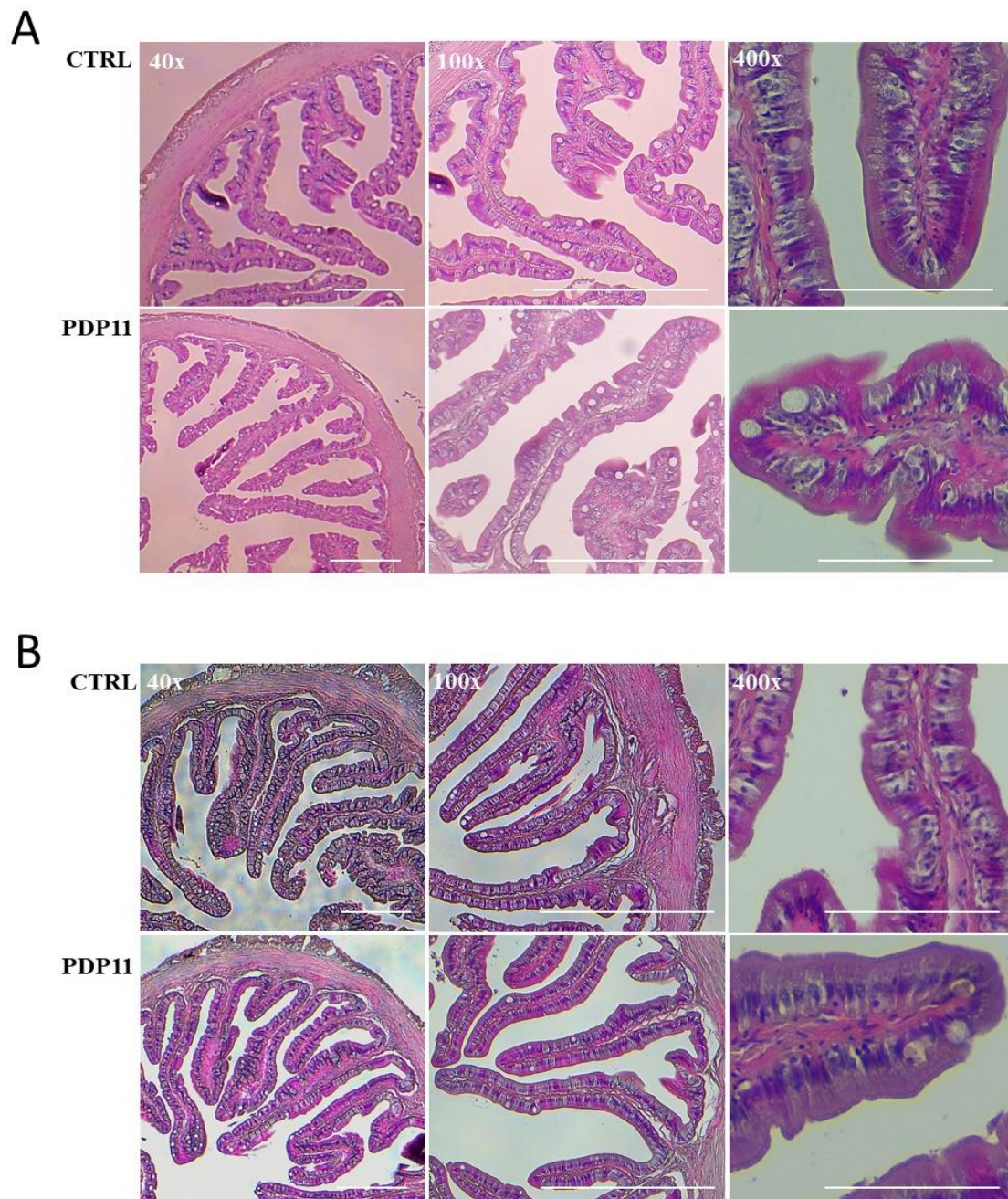


Figura 1. Vista a microscopía óptica de (A) intestino anterior y (B) intestino posterior de ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con dietas CTRL y PDP11, teñidas con hematoxilina y eosina. Imágenes, tomadas a diferentes aumentos (de izquierda a derecha; 40x, 100x y 400x). Las barras de escala se proporcionan en la parte inferior de cada imagen como referencia y representan 200, 200 y 50 μm en 40x, 100x y 400x, respectivamente.

Tabla 1. Resultados de los análisis morfométricos realizados en secciones de intestino anterior y posterior de ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con dietas CTRL y PDP11. Los datos se presentan como la media $\pm$ DE (N = 6). Las diferencias significativas ($p < 0,05$) se indican con *.

Parámetros	Intestino Anterior		Intestino Posterior	
	CTRL	PDP11	CTRL	PDP11
VH	320,35 $\pm$ 51,56	347,44 $\pm$ 83,80	276,60 $\pm$ 83,90	282,59 $\pm$ 74,92
VD	42,72 $\pm$ 7,27	54,41 $\pm$ 10,01*	44,02 $\pm$ 12,14	47,15 $\pm$ 11,23
SE	33,50 $\pm$ 7,55	26,48 $\pm$ 7,41	32,21 $\pm$ 10,97	32,17 $\pm$ 15,98
MU	47,44 $\pm$ 12,80	54,62 $\pm$ 17,61	38,27 $\pm$ 9,01	42,96 $\pm$ 16,72
SM	15,36 $\pm$ 5,20	18,08 $\pm$ 5,96	19,66 $\pm$ 7,90	15,40 $\pm$ 3,04
LP	10,13 $\pm$ 0,39	8,08 $\pm$ 1,39*	11,84 $\pm$ 0,84	8,88 $\pm$ 0,43*
EH	15,10 $\pm$ 3,12	12,52 $\pm$ 1,87*	12,74 $\pm$ 2,34	11,10 $\pm$ 2,19*

CTRL: dieta de control; PDP11: dieta suplementada con células sonicadas de la cepa SpPdp11. Altura de las vellosidades (VH); diámetro de las vellosidades (VD); grosor de la capa serosa (SE); grosor de la capa muscular (MU); grosor de la capa submucosa (SM); grosor de la lámina propia (LP) y altura de los enterocitos (EH).

3.2. Respuesta transcriptómica del intestino de *S. senegalensis*

Se llevó a cabo el análisis de ARN-seq para obtener una comprensión exhaustiva de las alteraciones transcriptómicas en el intestino de *S. senegalensis* resultantes de la suplementación dietética del probiótico sonificado SpPdp11.

La secuenciación Illumina produjo un total de 929 576 663 lecturas brutas. El recuento final de lecturas por individuo osciló entre 42 253 485 y 3 309 528, con una tasa media de mapeo del 53,00% $\pm$ 3,01% (media $\pm$ DE).

Para identificar los genes expresados diferencialmente (DEG), se compararon los perfiles de ARN-seq de los individuos de *S. senegalensis* del grupo CTRL con los del grupo PDP11, tanto en la sección anterior como posterior del intestino. Sólo se consideraron los resultados confirmados por *DESeq2* con un $|\text{Log}_2\text{FC}| \geq 2$ y un valor p corregido $< 0,05$, resultando un total de 247 DEG en la sección anterior y 197 DEG en la sección posterior (Figura 2).

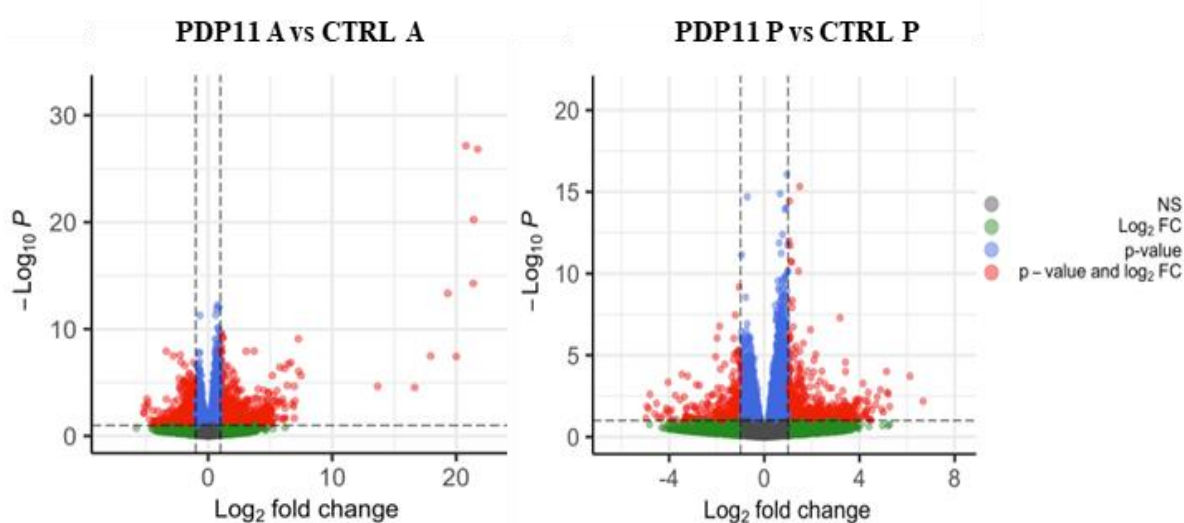


Figura 2. Los diagramas de volcán ilustran las diferencias de expresión génica entre condiciones. El eje X representa el $\text{Log}_2 \text{FC}$, el eje Y representa la significación estadística (valor de $-\text{Log}_{10} p$ corregido). Los puntos grises representan genes con diferencias que no son estadísticamente significativas (NS). Los puntos verdes representan los genes que cumplen el umbral $\text{Log}_2 \text{FC}$ pero no el criterio de valor p para la significación. Los puntos azules representan genes que superan el criterio del valor p pero no el umbral $\text{Log}_2 \text{FC}$. Los puntos rojos que se encuentran en las esquinas superiores derecha o izquierda, representan genes con cambios de expresión que se consideraron significativos (DEG).

Tras la identificación de los DEG, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento funcional para evaluar las posibles funciones enriquecidas dentro de estos conjuntos comparativos. En la sección anterior, al comparar los peces alimentados con SpPdp11 sonificado con el grupo de control, se observaron diferencias significativas en la expresión de genes asociados con la biosíntesis primaria de ácidos biliares, las vías de señalización del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR) y la interacción de receptores de la matriz extracelular (ECM) (Figura 3A). En el grupo PDP11 el desglose de las rutas mostró la sobreexpresión de la mayoría de los genes asociados con la vía de biosíntesis primaria de ácidos biliares (Figura suplementaria 1) y la supresión de genes en la ruta de interacción del receptor ECM (Figura suplementaria 2), sin embargo, la tendencia dentro de las vías de señalización PPAR es menos evidente (Figura suplementaria 3).

Aunque también se estudió el enriquecimiento funcional del tejido posterior, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Figura 3B).

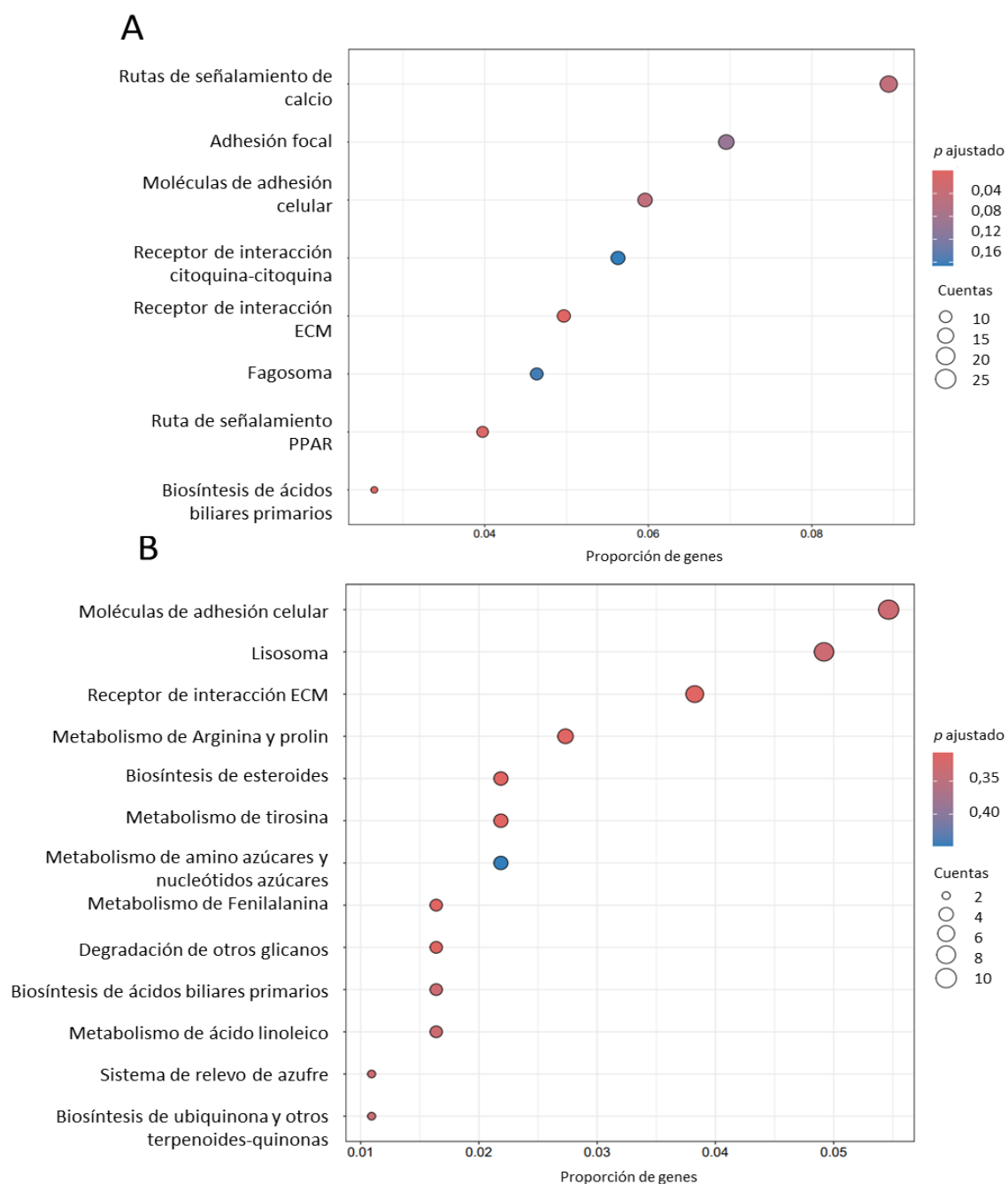


Figura 3. Diagrama de puntos que ilustra los resultados del enriquecimiento funcional comparando *S. senegalensis* alimentado con la dieta control (CTRL) y con la suplementada con SpPdp11 sonicada (PDP11) en la sección intestinal (A) anterior y (B) posterior. El eje horizontal representa la proporción de genes, el eje vertical muestra las rutas KEGG y los colores indican el valor de significación de p ajustado.

En la microbiota intestinal, *Proteobacteria* fue el filo más predominante en el intestino anterior de los peces alimentados con la dieta control, mientras que este mismo filo y *Spirochaetota* fueron los más abundantes en las secciones de intestino posterior de estos mismos ejemplares (Figura 5). En el caso de los peces que recibieron la dieta paraprobiótica, *Proteobacteria* y *Firmicutes* fueron los filos más

abundantes tanto en las muestras de intestino anterior como posterior (Figura 5). No obstante, es importante destacar que el porcentaje de Proteobacteria fue menor y el de *Firmicutes* mayor en comparación con el grupo CTRL.

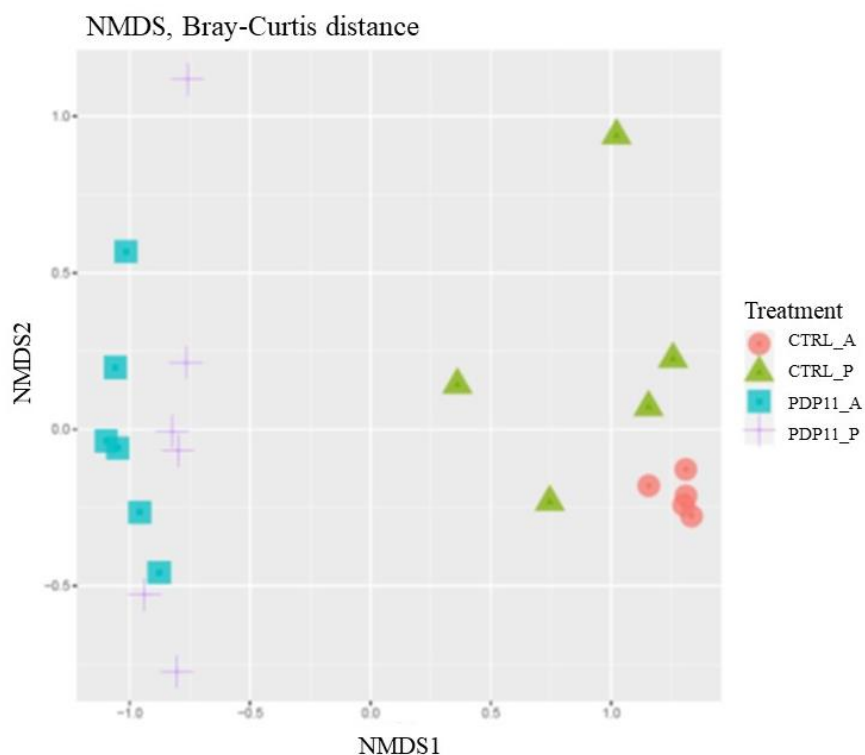


Figura 4. Gráfico NMDS de la composición de la comunidad bacteriana a nivel de ASV basado en la matriz de distancias de Bray-Curtis. Las muestras individuales están codificadas por colores en función de las dietas administradas a especímenes de *S. senegalensis*. Control (CTRL) y SpPdp11 suplementado (PDP11) en (A) secciones intestinales anterior y (P) posterior.

En todos los casos, las Gammaproteobacteria constituían la clase predominante en la microbiota *S. senegalensis*. La clase *Spirochaetota* también fue predominante en el intestino posterior de los peces alimentados con la dieta paraprobiótica. Los especímenes alimentados con la dieta paraprobiótica mostraron una mayor abundancia en el porcentaje de las clases *Bacilli* y *Clostridia*, mientras que la abundancia de las clases *Campylobacteria* y *Brevinematia* se redujo, especialmente en la sección intestinal posterior (Figura suplementaria 4).

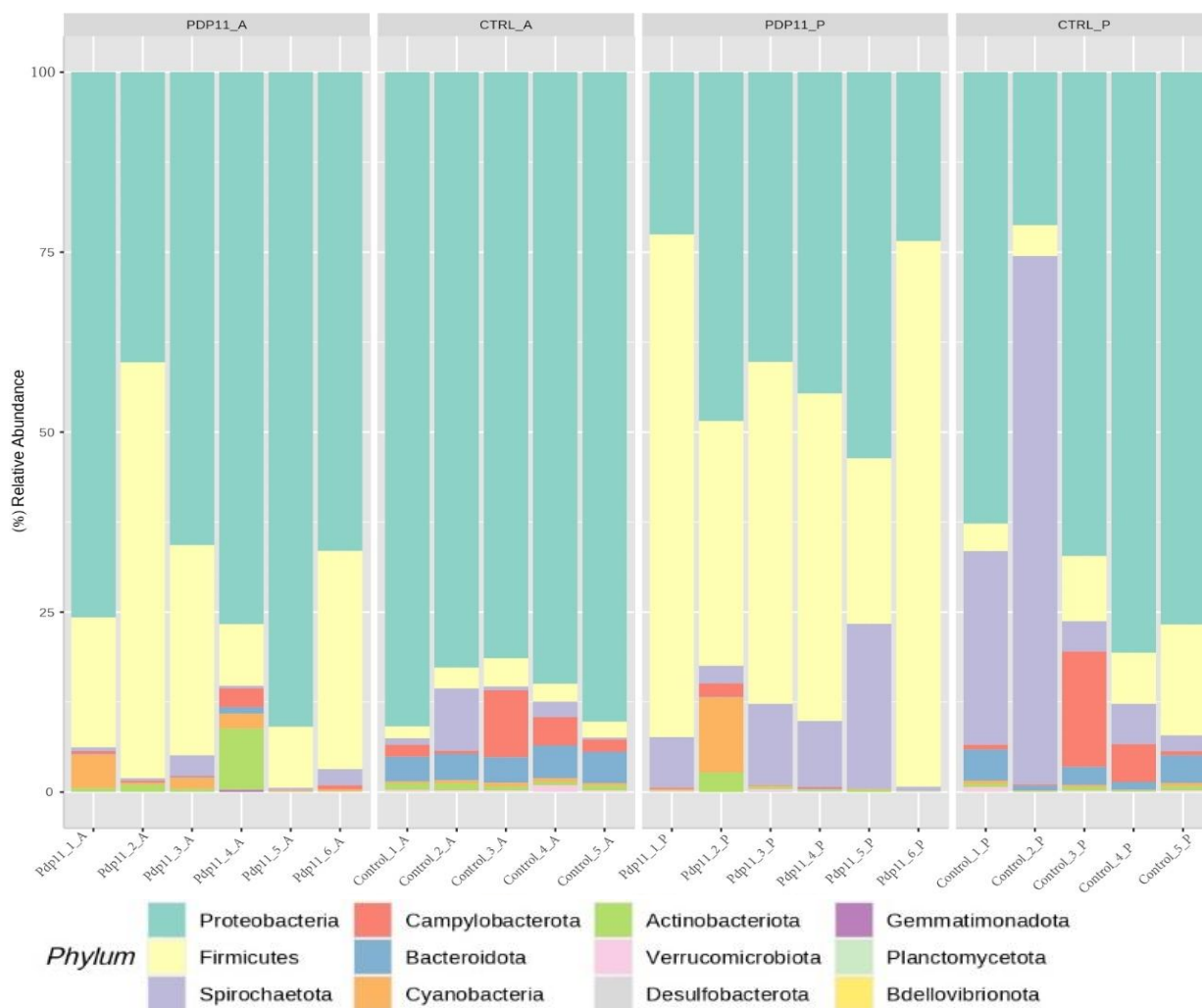


Figura 5. Diagrama de barras de las abundancias relativas a nivel de filo por muestra del tracto gastrointestinal de *S. senegalensis*. Control (CTRL) y SpPdp11 suplementado (PDP11) en las secciones (A) anteriores y (P) posteriores.

El análisis taxonómico a nivel de género (Figura Suplementaria 5) mostró la existencia de un núcleo (“core”) central detectados con una alta prevalencia en los peces analizados, independientemente de la dieta y la sección intestinal estudiada (Figura 6). Este núcleo estaba compuesto principalmente por *Vibrio*, el género más abundante, con una abundancia de al menos un 17,6% en el 60% de las muestras, seguido por *Mycoplasma*, *Pseudomonas*, y *Acinetobacter* como constituyentes clave de esta microbiota central.

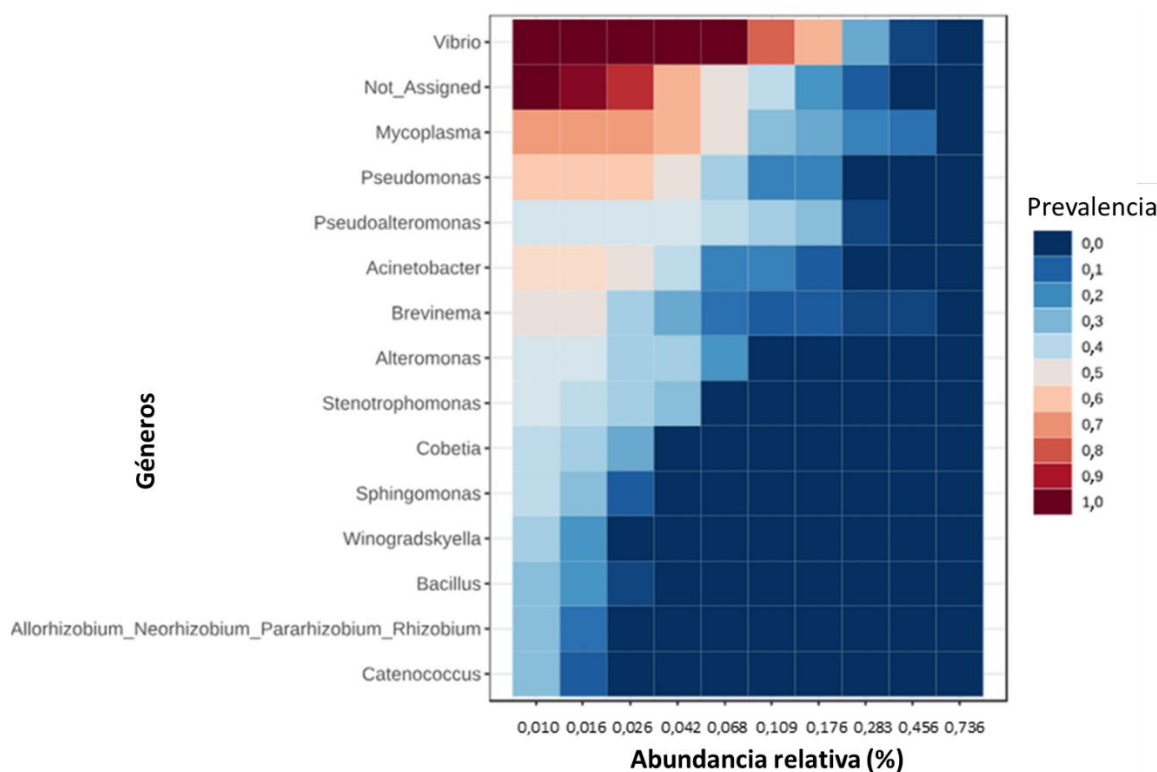


Figura 6. Prevalencia de géneros bacterianos comunes en la microbiota de *Solea senegalensis* alimentados con dieta de control y dieta suplementada con el paraprobiótico sonificado (SpPdp11). La escala de colores (azul a rojo) representa la proporción de muestras en las que se detecta cada género por encima del 1 % abundancia relativa.

Las diferencias en la abundancia taxonómica entre las dietas fueron corroboradas por el análisis LEfSe, revelando un perfil distintivo que caracterizaba la composición microbiana de los grupos CTRL y PDP11 (Figura suplementaria 6). Considerando los 10 géneros que mostraron la tasa de cambio de abundancia más pronunciada entre tratamientos (ocho de los cuales forman parte del núcleo previamente mencionado) (Figura 7), se identificaron variaciones significativas en *Mycoplasma*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aliivibrio*, *Ralstonia*, y *Alteromonas*. Estos géneros mostraron un aumento significativo de abundancia en ambas secciones intestinales del grupo PDP11 en comparación con los especímenes CTRL. En contraste, *Pseudoalteromonas*, *Stenotrophomonas*, *Cobetia*, y *Sphingomonas* mostraron una abundancia significativamente mayor en los peces que recibieron la dieta de control en comparación con los alimentados con la dieta paraprobiótica.

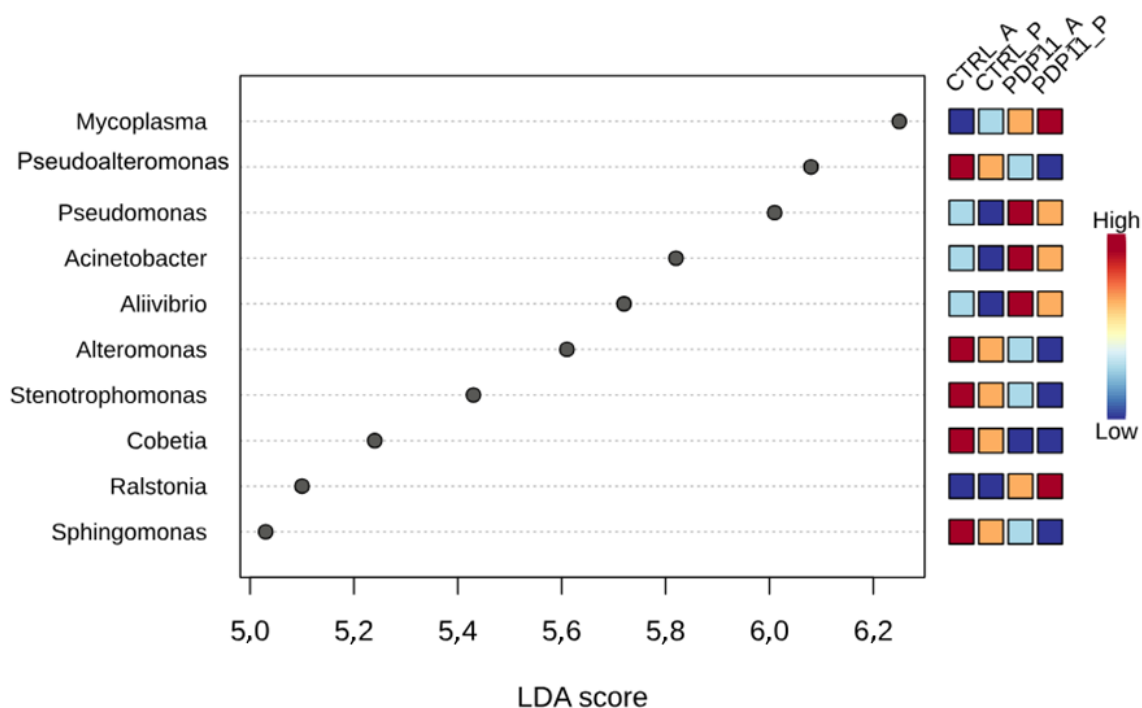


Figura 7. Las 10 diferencias más significativas identificadas por LEfSe a nivel de género. Se realizó la comparación entre tratamientos: grupo control (CTRL) y grupo de peces alimentados con suplementación de SpPdp11 sonificado (PDP11); y entre secciones: sección intestinal anterior (A) y la sección intestinal posterior (P). El gradiente de color explica el porcentaje de abundancia del género en comparación con el resto de los grupos experimentales.

Posteriormente, PICRUSt2 predijo la funcionalidad potencial de la microbiota gastrointestinal en estas muestras. Se observó una presencia significativamente mayor de genes asociados con el sistema de dos componentes en el grupo PDP11, tanto en el intestino anterior como en el posterior, en comparación con el grupo CTRL (Figuras 8A y 8B). Además, se predijo una abundancia diferencial de genes relacionados con la formación de biopelículas y el transportador ABC en las secciones anterior y posterior del intestino, respectivamente, en el grupo PDP11 frente al grupo CTRL (Figuras 8A y 8B).

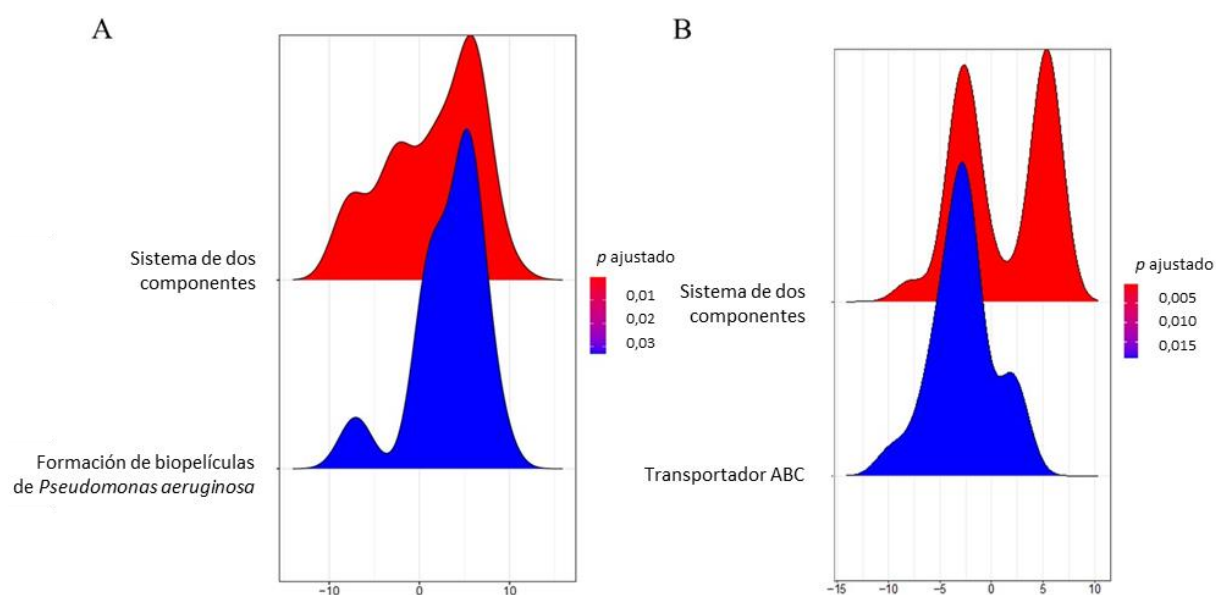


Figura 8. Rutas significativas de genes inferidos utilizando PICRUSt2 para la microbiota del tracto digestivo de *S. senegalensis*. Comparación entre peces alimentados con suplementación sonicada de SpPdp11 (PDP11) vs. la dieta control (CTRL) en: (A) secciones anteriores y (B) secciones posteriores del intestino. Valores de p ajustados con Benjamini-Hochberg.

4. Discusión

Un número cada vez mayor de investigaciones se centran en el estudio de los efectos de la incorporación de probióticos en la salud intestinal de los peces. Sin embargo, aunque los paraprobióticos pueden considerarse una herramienta útil para incluir en el diseño de piensos funcionales y conseguir una acuicultura más sostenible, todavía no hay suficiente información sobre los efectos de su uso en las dietas en acuicultura.

Es bien sabido que un intestino sano en animales es fundamental para su bienestar general y la mejora de la producción. La integridad del epitelio intestinal juega un papel crucial para facilitar la digestión eficiente y la absorción de nutrientes (Dawood, 2021). Por tanto, preservar la integridad física de la barrera intestinal es necesario para promover la salud del animal. Los análisis histomorfológicos son un buen biomarcador para comprobar el efecto de una dieta sobre el estado del tejido digestivo (Afsa y col., 2022, 2023; Noureen y col., 2023; Rohani y col., 2022), dado que un uso inadecuado de estos aditivos alimentarios puede ejercer efectos negativos sobre la estructura intestinal provocando un proceso inflamatorio (Cerezuela y col., 2013). Los resultados del análisis microscópico mostraron un aspecto sano de ambas secciones intestinales, evidenciándose una estructura y organización natural de las vellosidades

intestinales (“dedos de guante”) con los núcleos de los enterocitos alineados en la región basal de las células y una estructura típica de “ribete en cepillo” en la zona apical. Las mediciones morfométricas en las muestras de intestino anterior y posterior revelaron un mayor diámetro de las vellosidades, mayor altura de los enterocitos y menor espesor de la lámina propia en las secciones anteriores y posteriores del intestino de los peces alimentados con la dieta paraprobiótica.

La absorción de nutrientes se produce a través de las vellosidades intestinales, y los enterocitos, juegan un papel crucial en el proceso (Hu y col., 2016). Un estudio sobre la suplementación con proteasas en la dieta de tilapia del Nilo mostró un aumento en la altura y el ancho de las vellosidades intestinales (Saleh y col., 2022) sugiriendo una mejora en la absorción de nutrientes. Abozeid y col., (2021) confirmaron que un aumento en la altura y el ancho de las vellosidades son factores cruciales para mantener un intestino sano en la tilapia del Nilo. En los peces que recibieron la dieta paraprobiótica, el aumento significativo del diámetro y ancho de las vellosidades, así como valores más altos en la altura de las mismas, apuntan a una mejora de la superficie intestinal que resultaría en una absorción de nutrientes más eficiente.

El espesor de la lámina propia es un parámetro utilizado como indicador del proceso inflamatorio del tejido conectivo de la mucosa intestinal, debido a la infiltración de un elevado número de leucocitos (Vizcaíno y col., 2014). Se ha informado de la reducción del espesor de la capa submucosa intestinal mediante la administración dietética de probióticos como las bacterias del ácido láctico (BAL). Así, la administración de *Lactobacillus brevis* y *L. buchneri* a *Seriola dumerili* que recibía una dieta con aceites vegetales en sustitución del aceite de pescado, redujo el espesor de la lámina propia (Milián-Sorribes y col., 2021). Además, Nimalan y col. (2023) también observaron que la suplementación de una dieta de harina de soja con *L. plantarum* y *L. fermentum* redujo el ancho de la lámina propia, sugiriendo una relación con la prevención de enteritis en ejemplares de *Salmo salar*. Todos estos estudios analizaron los efectos de células probióticas, pero nuestro trabajo es el primero que se centra en describir estos efectos en un paraprobiótico aplicado a peces.

Los cambios histológicos observados en las muestras intestinales están relacionados con la información obtenida en el análisis del transcriptoma intestinal de *S. senegalensis* que recibió la dieta paraprobiótica. En primer lugar, no se observaron funciones alteradas en la región intestinal posterior de los peces alimentados con la dieta que incluía células probióticas sonicadas, en

comparación con la zona anterior. Por otro lado, el menor estado antiinflamatorio de la lámina propia puede estar relacionado con la regulación negativa de los genes correspondientes a la matriz extracelular en la sección intestinal anterior de los peces que reciben la dieta paraprobiótica. La matriz extracelular (ECM) se remodela continuamente mediante la creación de proteínas recién sintetizadas, como colágeno, lamininas y elastina. La ECM tiene profundas influencias en la estructura, viabilidad y funciones de las células, aunque ciertos fragmentos derivados de la matriz extracelular exhiben la capacidad de atraer células inflamatorias. Se ha informado que los péptidos derivados de la ECM tienen actividad quimiotáctica para las células inflamatorias, incluidos los tipos de colágeno I y IV, elastina, fibronectina, lamininas, entactina/nidogeno, trombospondina y hialuronano (Adair-Kirk y Senior, 2008; Castillo-Briceño y col., 2010). También, la remodelación excesiva de la ECM se ha relacionado con la inflamación intestinal crónica en humanos (Mortensen y col., 2019).

Además, las alteraciones en los patrones de expresión génica en el intestino anterior parecen mostrar una respuesta potencial en la salud del intestino. La vía primaria de los ácidos biliares, sobreexpresada en la dieta suplementada con el paraprobiótico, está estrechamente relacionada con el colesterol. El colesterol juega un papel crucial en la composición de la membrana celular y sirve como precursor de importantes metabolitos secundarios como los esteroides. Puede obtenerse de la dieta o sintetizarse *de novo*, y la conversión del colesterol en ácidos biliares representa una de las principales vías para la eliminación del exceso de colesterol del organismo (Kortner y col., 2014). En nuestros resultados observamos una regulación positiva en la ruta primaria de los ácidos biliares en *S. senegalensis*, que puede atribuirse a una inclusión adecuada de colesterol en su dieta. Se ha descrito que los niveles insuficientes de colesterol comprometen la inmunidad al suprimir el sistema inmunitario innato y adaptativo, y potencia la respuesta inflamatoria al aumentar la expresión de citoquinas proinflamatorias y, al mismo tiempo, disminuir la de citoquinas antiinflamatorias (Wang y col., 2018). Además, los ácidos biliares sirven como detergentes fisiológicos, acelerando la absorción y transporte de lípidos, vitaminas y nutrientes mediante la activación de receptores nucleares que, a su vez, regulan el metabolismo y contribuyen significativamente a la salud general (Romano y col., 2020). Wang y col., (2023) observaron que la inclusión de ácidos biliares exógenos resultó en la promoción del crecimiento, menor acumulación de lípidos, mejora de la capacidad antioxidante y de la inmunidad, así como el reequilibrio de la microbiota intestinal.

El metabolismo de los lípidos está regulado por dos factores clave, los ácidos biliares y la microbiota intestinal (Claesson y col., 2012; Yoshimoto y col., 2013). En el caso de los mamíferos, cada vez hay más evidencia de una estrecha correlación entre esos dos factores (Liu y col., 2016; Ridlon y col., 2006; Yokota y col., 2012), correlación que también se ha observado en peces (Xiong y col., 2018). Los ácidos biliares ejercen una doble influencia sobre la microbiota del intestino como agentes antimicrobianos secretados al lumen intestinal (Kurdi y col., 2006), e indirectamente induciendo péptidos antimicrobianos y lectinas a través de sus receptores (D'Aldebert y col., 2009; Inagaki y col., 2006). Además, la microbiota intestinal desempeña un papel de biotransformación de los ácidos biliares al degradar las sales biliares mediante desconjugación, oxidación de los ácidos biliares y epimerización (Ridlon y col., 2006, 2014). Por lo tanto, la microbiota intestinal es fundamental para regular los niveles y la composición de los ácidos biliares en diversos tejidos (Swann y col., 2011), y tiene el potencial de cambiar la fisiología y el metabolismo del hospedador.

Se observó una notable desregulación de PPAR, un receptor nuclear que juega un papel crucial en la regulación del metabolismo lipídico (Kim y col., 2021; Wahli y Michalik, 2012). PPAR está presente en abundancia en el tracto gastrointestinal, especialmente en células epiteliales (Mukherjee y col., 1997). La expresión reducida de PPAR- γ y su actividad disminuida en ratones conducen a una condición conocida como esteatorrea, caracterizada por un exceso de grasa en las heces (Harmon y col., 2010). Además, los LPS bacterianos estimulan la expresión de PPAR γ y activa NF- κ B (Wahli, 2008). Teniendo en cuenta que el NF- κ B desempeña un papel decisivo en la regulación de la respuesta al estrés o a los antígenos bacterianos, una disminución de los niveles de PPAR podría indicar una reducción de los procesos infecciosos o de las respuestas relacionadas con el estrés.

Por otro lado, en comparación con los peces alimentados con la dieta de control, se detectó una disminución significativa del índice de diversidad alfa, independientemente de la sección intestinal estudiada, en los peces que recibieron la dieta paraprobiótica, lo que demuestra la capacidad de las células sonicadas de SpPdp11 para modular la microbiota intestinal. Este resultado concuerda con los obtenidos por otros autores que informaron que los aditivos en la dieta y los piensos ejercen una presión selectiva sobre la composición microbiana gastrointestinal en vertebrados, incluidos los peces (Egerton y col., 2018; Rimoldi y col., 2018).

Al igual que en nuestro trabajo, un estudio previo realizado con ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con una dieta suplementada con células SpPdp11 inactivadas por calor (Domínguez-Maqueda y col., 2021), observó en secciones intestinales posteriores una reducción de la diversidad, mientras que en el intestino anterior se produjo un aumento. De manera similar, Acosta y col., (2022) reportaron una reducción de la diversidad del tracto intestinal de ejemplares de *S. senegalensis* cuando se complementó una dieta suplementada con vitamina K1. Habitualmente se considera que una menor diversidad de la microbiota intestinal podría afectar negativamente su funcionalidad, ya que existía una gama más amplia de microorganismos que podría realizar un número diverso de funciones (Falony y col., 2016; Lyons y col., 2017; Noor y col., 2010). No obstante, la dominancia (índice de Simpson) está relacionada con las funciones del ecosistema, afectando a la ejecución de procesos a través de la identidad de las especies (el rasgo dominante) y la uniformidad (la distribución de frecuencia de estos rasgos), e influye indirectamente en la relación entre la ejecución de procesos y la riqueza de especie (Hillebrand y col., 2008; Lozano y Rillig, 2020), siendo en nuestro estudio valores que no variaron significativamente entre grupos.

Proteobacteria, y especialmente las *Gammaproteobacteria*, fueron el filo y clase más predominante respectivamente, en ambas secciones intestinales, resultados que concuerdan con los obtenidos por Tapia-Paniagua y col., (2019) y Acosta y col., (2022). En contraste, Domínguez-Maqueda y col., (2021) reportaron este predominio de proteobacterias solo en las secciones intestinales anteriores de *S. senegalensis* mientras que en el caso del intestino posterior observaron que *Spirochaetota* era el filo predominante. Este filo fue el segundo filo más abundante en las secciones intestinales posteriores de peces alimentados con la dieta de control en nuestro estudio. Por el contrario, las abundancias de estos grupos taxonómicos mostraron una reducción significativa en ambas secciones intestinales de los ejemplares alimentados con la dieta paraprobiótica. Las proteobacterias son bacterias con capacidades metabólicas altamente flexibles y, como microorganismos Gram negativos, contienen lipopolisacárido (LPS) en la membrana externa. El LPS induce la liberación de citoquinas proinflamatorias (Du y col., 2022). Con base en la reducción significativa de la abundancia de este filo, incluyendo *Gammaproteobacteria*, observada en peces alimentados con la dieta paraprobiótica, se podría sugerir que existe relación con el mejor estado de la lámina propia detectado en estos ejemplares y la regulación negativa de la

transcripción de genes de rutas como la interacción del receptor ECM y la vía de señalización PPAR que están involucradas en el proceso inflamatorio.

Vibrio es uno de los géneros bacterianos más comunes en *S. senegalensis* (Carballo y col., 2019), hallazgo que también se ha demostrado en esta investigación. Este género contiene cepas patógenas bien conocidos (Ina-Salwany y col., 2019), pero no todas son patógenas. Varias especies de *Vibrio* son reconocidas por su capacidad para producir enzimas hidrolíticas, las cuales actúan como simbioses facilitando la digestión de los componentes de la dieta (Egerton y col., 2018). Investigaciones previas han demostrado que estas bacterias pueden producir una variedad de enzimas como amilasa, quitinasa, lipasa y proteasa (Henderson y Millar, 1998; Itoi y col., 2006; Ray y col., 2012). Esto podría atribuirse a las complejas interacciones entre las especies del género *Vibrio*, que se adaptan a los cambios en la dieta para mantener la estabilidad del ecosistema y la consistencia funcional. De cualquier forma, son necesarios más estudios sobre las interacciones de estas especies y sus posibles funciones.

El consumo de una dieta probiótica SpPdp11 sonicada provocó alteraciones significativas en la composición microbiana en las secciones intestinales anterior y posterior del intestino de *S. senegalensis*. Esta suplementación dietética con paraprobióticos resultó en un aumento notable en las poblaciones de *Mycoplasma*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Alivibrio* y *Ralstonia*, géneros comúnmente encontrados en el tracto digestivo de animales acuáticos (Egerton y col., 2018; Lyons y col., 2017).

Aunque algunas especies de *Pseudomonas* se consideran patógenas (Derome y col., 2016), otras han sido empleadas como organismos probióticos en acuicultura debido a su capacidad para suprimir importantes agentes fúngicos y bacterianos, como *Saprolegnia* y *Aeromonas* (Das y col., 2006; Liu y col., 2015). También han mostrado resultados prometedores en el control de otras enfermedades emergentes. Por ejemplo, *P. fluorescens* se ha utilizado como probiótico para combatir bacterias patógenas como *P. anguilliseptica* y *S. faecium* en tilapia del Nilo (Eissa y col., 2014). Además, una cepa de *P. monteilii* procedente del intestino de pescado ha demostrado actividad antimicrobiana, y su principal metabolito, la 1-hidroxifenazina, es capaz de inhibir a *Aeromonas hydrophila* (Qi y col., 2020).

Se ha documentado una mayor abundancia de *Mycoplasma* en *Salmon salar* sano en comparación con individuos enfermos, observándose una correlación positiva entre la abundancia de *Mycoplasma* y el peso del pez. Esto parece sugerir una relación potencialmente simbiótica entre *Mycoplasma* y su hospedador (Bozzi y

col., 2021). Igualmente, Brown y col., (2019) han revelado que en la microbiota intestinal de la trucha arcoíris se encuentran secuencias asociadas con especies de *Mycoplasma* no clasificadas, que son más abundantes en líneas resistentes a *Flavobacterium psychrophilum*, en comparación con peces susceptibles.

Acinetobacter, que también formaba parte del núcleo bacteriano descrito en este análisis, mostró una abundancia significativa en el grupo PDP11, especialmente en las secciones intestinales posteriores. Los miembros del grupo *Actinobacter* son capaces de producir butirato (Parada-Venegas y col., 2019), un ácido graso de cadena corta (AGCC), que tiene efectos beneficiosos comprobados en *S. aurata* (Estensoro y col., 2016).

La existencia de taxones que contienen cepas microbianas con patógenos reconocidos, no tiene por qué tener efectos negativos en los peces, ya que la patogenicidad dependen de los factores de virulencia, la dosis mínima infectiva o de las condiciones del hospedador (Li y col., 2011). Se podría sugerir que estos microorganismos encontrados, no están ejerciendo una patogenicidad activa, sino que podrían estar implicados en componentes centrales del microbioma que contribuyen a la salud de los peces (Yajima y col., 2023), mediante diferentes mecanismos como la exclusión competitiva de microorganismos patógenos (Bidhan y col., 2014; Moriarty, 1998) o mediante la activación del sistema inmunitario de los peces (Gomez y col., 2013; Yukgehnaish y col., 2020). Es evidente que se necesita un mayor número de estudios y diferentes modelos para descifrar el abanico de interacciones entre un microorganismo y su hospedador. Además, hay que considerar el hecho de que estas interacciones pueden verse afectadas por otros microorganismos de la propia microbiota, lo que complica aún más las conclusiones sobre la función de un microorganismo aislado (Jochum y Stecher, 2020). Para contemplar estas posibilidades que influyen en el desenlace de la interacción entre el microorganismo y el hospedador, hay autores que proponen el concepto de patógeno potencial (Casadevall, 2017; Jochum y Stecher, 2020).

Además, el aumento de la prevalencia de *Ralstonia* en el grupo que recibe probiótico sonificado indica una respuesta específica a la intervención dietética probiótica. Este género podría presentar actividad antimicrobiana, biosíntesis de compuestos bioactivos y puede producir metabolitos secundarios beneficiosos para el hospedador (Cerezo-Ortega y col., 2021; Jami y col., 2015).

De acuerdo con los resultados obtenidos, aunque la funcionalidad de la microbiota intestinal de los peces alimentados con dieta paraprobiótica, inferida

a partir de la composición y abundancia taxonómica detectada, apenas se vio afectada, se observaron algunos cambios significativos. Específicamente, se observó una regulación significativa de genes asociados al sistema de dos componentes tanto en intestino anterior como posterior. Además, genes relacionados con la formación de biopelículas se regularon al alza en las secciones intestinales anteriores, mientras que los genes relacionados con el transportador ABC se reguló a la baja en las secciones posteriores.

Las bacterias muestran comportamientos receptivos y se adaptan activamente a su entorno a través de una serie de mecanismos de detección vitales para regular el estado celular en respuesta a los cambios en las condiciones locales, lo que permite a las bacterias adaptarse rápidamente a los factores ambientales cambiantes (Meng y col., 2023; Shaw y col., 2022). Un mecanismo de respuesta implica sistemas reguladores de dos componentes (TCS) que vinculan los estímulos externos al control de la expresión génica a través de una cascada de autofosforilación que traduce señales de membrana a ubicaciones intracelulares. Los TCS son reguladores clave implicados en importantes procesos celulares (Freeman y col., 2013; Groisman, 2016) como la formación de biopelículas (Mikkelsen y col., 2011; Sultan y col., 2021). La regulación al alza de los TCS podría estar relacionada con la regulación al alza de la formación de biopelículas detectada en el intestino posterior de los peces alimentados con la dieta paraprobiótica, teniendo especialmente en cuenta el aumento de la abundancia de *Pseudomonas* en estos peces. Además, algunas enzimas ribonucleótido reductasa son importantes en el crecimiento de la biopelícula de *Pseudomonas* y requieren un cofactor de vitamina B12 para su actividad enzimática (Fang y col., 2017). Rasmussen y col., (2022) encontraron altos niveles de vitamina B en la trucha arcoíris asociados con una mayor presencia de cepas de *Mycoplasma*. *Mycoplasmataceae* son notablemente abundantes en la sección posterior del grupo PDP11. También se ha sugerido un papel importante de este género en el metabolismo de los lípidos en los salmónidos (Rasmussen y col., 2023) y se relaciona su abundancia con el bienestar de estos peces (Bozzi y col., 2021; Brown y col., 2019; Kousoulaki y col., 2021).

La superfamilia de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) facilita la captación y el transporte de compuestos del medio extracelular al citoplasma. Las bacterias Gram negativas están recubiertas de LPS, que consiste en un lípido A y un oligosacárido central (denominado núcleo lipídico A) y una cola de polisacárido repetitivo O-antígeno. Los transportadores ABC desempeñan un

papel importante en la translocación tanto del núcleo lipídico A como de los componentes polisacáridos del antígeno O durante la biogénesis del LPS (Lewis y col., 2012). La regulación a la baja de esta funcionalidad en el intestino posterior de los peces alimentados con la dieta paraprobiótica podría estar relacionada con la mayor reducción de la abundancia de proteobacterias detectada en esta sección intestinal de estos peces. Sin embargo, sería prudente realizar estudios a más largo plazo para concluir si estos cambios en la microbiota intestinal pueden repercutir en la salud general.

Las evidencias obtenidas en este estudio demuestran resultados prometedores en el uso de dietas con el paraprobiótico de SpPdp11, obtenido por sonicación de sus células, en *S. senegalensis* con respecto a la salud intestinal y la respuesta inflamatoria. Las secciones histológicas indican un estado saludable, junto con signos de propiedades antiinflamatorias y una mejor absorción de nutrientes. La modulación de genes en la sección anterior sugiere también funciones antiinflamatorias. Además, se ha demostrado una modulación de la microbiota intestinal por la dieta paraprobiótica, con una reducción significativa de la abundancia del filo *Proteobacteria* que podría estar relacionada con el menor estado inflamatorio detectado en el intestino de los ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con la dieta suplementada con paraprobióticos.

Referencias

- Abozeid, A. M., Abdel-Rahim, M. M., Abouelenien, F., Elkaradawy, A., & Mohamed, R. A. (2021). *Quillaja saponaria* and/or *Yucca schidigera* ameliorate water quality, growth performance, blood health, intestine and gills histomorphology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research*, 52(12), 6117–6131. <https://doi.org/10.1111/are.15474>
- Abul, M., Azad, K., Sarker, M., Li, T., & Yin, J. (2018). Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *BioMed research international*. <https://doi.org/10.1155/2018/9478630>
- Acosta, M., Quiroz, E., Tovar-Ramírez, D., Roberto, V. P., Dias, J., Gavaia, P. J., & Fernández, I. (2022). Fish microbiome modulation and convenient storage of aquafeeds when supplemented with vitamin K1. *Animals*, 12(23), 3248. <https://doi.org/10.3390/ani12233248>
- Adair-Kirk, T. L., & Senior, R. M. (2008). Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(6–7), 1101–1110. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.12.005>
- Afsa, S., De Marco, G., Cristaldi, A., Giannetto, A., Galati, M., Billè, B., Oliveri Conti, G., ben Mansour, H., Ferrante, M., & Cappello, T. (2023). Single and combined effects of caffeine and salicylic acid on mussel *Mytilus galloprovincialis*: Changes at histomorphological, molecular and biochemical levels. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 101, 104167. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104167>
- Afsa, S., De Marco, G., Giannetto, A., Parrino, V., Cappello, T., ben Mansour, H., & Maisano, M. (2022). Histological endpoints and oxidative stress transcriptional responses in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to realistic doses of salicylic acid. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 92(September 2021), 103855. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103855>
- Bancroft, J. D., & Gamble, M. (Eds.). (2008). *Theory and practice of histological techniques*. Elsevier health sciences.
- Belkaid, Y., & Hand, T. W. (2014). Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Leading Edge Review*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>
- Bidhan C. D., Meena, D. K., Behera, B. K., Das, P., Das Mohapatra, P. K., & Sharma, A. P. (2014). Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(3), 921–971. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9897-0>
- Bozzi, D., Rasmussen, J. A., Carøe, C., Sveier, H., Nordøy, K., Gilbert, M. T. P., & Limborg, M. T. (2021). Salmon gut microbiota correlates with disease infection status: potential for monitoring health in farmed animals. *Animal Microbiome*, 3(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00096-2>
- Brown, R. M., Wiens, G. D., & Salinas, I. (2019). Analysis of the gut and gill microbiome of resistant and susceptible lines of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 86, 497–506. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.079>
- Carballo, C., Pinto, P. I. S., Mateus, A. P., Berbel, C., Guerreiro, C. C., Martinez-Blanch, J. F., Codoñer, F. M., Mantecon, L., Power, D. M., & Manchado, M. (2019). Yeast β -glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish & Shellfish Immunology*, 92, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.044>
- Casadevall, A. (2017). The Pathogenic Potential of a Microbe. *MSphere*, 2(1). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00015-17>

- Castillo-Briceño, P., Arizcun-Arizcun, M., Meseguer, J., Mulero, V., & García-Ayala, A. (2010). Correlated expression profile of extracellular matrix-related molecules during the inflammatory response of the teleost fish gilthead seabream. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(10), 1051–1058. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.05.007>
- Cerezo-Ortega, I. M., Di Zeo-Sánchez, D. E., García-Márquez, J., Ruiz-Jarabo, I., Sáez-Casado, M. I., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., & Tapia-Paniagua, S. T. (2021). Microbiota composition and intestinal integrity remain unaltered after the inclusion of hydrolysed *Nannochloropsis gaditana* in *Sparus aurata* diet. *Scientific Reports*, 11(1), 18779. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98087-5>
- Cerezo, I. M., Pérez-Gómez, O., Bautista, R., Seoane, P., Esteban, M. Á., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., & Tapia-Paniagua, S. T. (2023). SpPdp11 Administration in diet modified the transcriptomic response and its microbiota associated in mechanically induced wound *Sparus aurata* skin. *Animals*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/ani13020193>
- Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S. T., Meseguer, J., Moriñigo, M. ángel, & Esteban, M. ángeles. (2013). Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(5), 1063–1070. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.015>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Choudhury, T. G., & Kamilya, D. (2018). Paraprobiotics: an aquaculture perspective. *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 1258–1270. <https://doi.org/10.1111/raq.12290>
- Claesson, M. J., Jeffery, I. B., Conde, S., Power, S. E., O'Connor, E. M., Cusack, S., Harris, H. M. B., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., O'Sullivan, O., Fitzgerald, G. F., Deane, J., O'Connor, M., Harnedy, N., O'Connor, K., O'Mahony, D., van Sinderen, D., Wallace, M., Brennan, L., & O'Toole, P. W. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 488(7410), 178–184. <https://doi.org/10.1038/nature11319>
- Cordero, H., Guardiola, F. A., Tapia-Paniagua, S. T., Cuesta, A., Meseguer, J., Balebona, M. C., Moriñigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2015). Modulation of immunity and gut microbiota after dietary administration of alginate encapsulated *Shewanella putrefaciens* Pdp11 to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.010>
- D'Aldebert, E., Biyeyeme Bi Mve, M., Mergey, M., Wendum, D., Firrincieli, D., Coilly, A., Fouassier, L., Corpechot, C., Poupon, R., Housset, C., & Chignard, N. (2009). Bile salts control the antimicrobial peptide cathelicidin through nuclear receptors in the human biliary epithelium. *Gastroenterology*, 136(4), 1435–1443. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.12.040>
- Das, B. K., Samal, S. K., Samantaray, B. R., Sethi, S., Pattnaik, P., & Mishra, B. K. (2006). Antagonistic activity of cellular components of *Pseudomonas* species against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 253(1–4), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.028>
- Dawood, M. A. (2021). Nutritional immunity of fish intestines: important insights for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 642–663. <https://doi.org/10.1111/raq.12492>
- de Almada, C. N., Martinez, R. C. R., & Sant'Ana, A. S. (2016). Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 58, 96–114. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.011>
- Derome, N., Gauthier, J., Boutin, S., & Llewellyn, M. (2016). *Bacterial Opportunistic Pathogens of Fish*, 81–108. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28170-4_4

- Díaz-Rosales, P., Arijo, S., Chabrillón, M., Alarcón, F. J., Tapia-Paniagua, S. T., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M. C., & Moriñigo, M. A. (2009). Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*, 293, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.050>
- Domínguez-Maqueda, M., Cerezo, I. M., Tapia-Paniagua, S. T., De, I. G., Banda, L., Moreno-Ventas, X., Moriñigo, M. Á., Balebona, M. C., & Pérez-Martínez, G. (2021). A tentative study of the effects of heat-inactivation of the probiotic strain *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on Senegalese Sole (*Solea senegalensis*) intestinal microbiota and immune response. *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040808>
- Du, L., Lei, X., Wang, J., Wang, L., Zhong, Q., Fang, X., Li, P., Du, B., Wang, Y., & Liao, Z. (2022). Lipopolysaccharides derived from gram-negative bacterial pool of human gut microbiota promote inflammation and obesity development. *International Reviews of Immunology*, 41(1), 45–56. <https://doi.org/10.1080/08830185.2021.1996573>
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The gut microbiota of marine fish. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>
- Eissa, N. (2014). Protective effect of *Pseudomonas fluorescens* as a probiotic in controlling fish pathogens. *American Journal of BioScience*, 2(5), 175. <https://doi.org/10.11648/j.ajbio.20140205.12>
- Estensoro, I., Ballester-Lozano, G., Benedito-Palos, L., Grammes, F., Martos-Sitcha, J. A., Mydland, L.-T., Caldach-Giner, J. A., Fuentes, J., Karalazos, V., Ortiz, Á., Øverland, M., Sitjà-Bobadilla, A., & Pérez-Sánchez, J. (2016). Dietary butyrate helps to restore the intestinal status of a marine teleost (*Sparus aurata*) fed extreme diets low in fish meal and fish oil. *PLOS ONE*, 11(11), e0166564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166564>
- Falony, G., Joossens, M., Vieira-Silva, S., Wang, J., Darzi, Y., Faust, K., Kurilshikov, A., Bonder, M. J., Valles-Colomer, M., Vandeputte, D., Tito, R. Y., Chaffron, S., Rymenans, L., Verspecht, C., Sutter, L. De, Lima-Mendez, G., D'hoë, K., Jonckheere, K., Homola, D., & Raes, J. (2016). Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*, 352(6285), 560–564. <https://doi.org/10.1126/science.aad3503>
- Fang, H., Kang, J., & Zhang, D. (2017). Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0631-y>
- Foucault, P., Gallet, A., Duval, C., Marie, B., & Duperron, S. (2022). Gut microbiota and holobiont metabolome composition of the medaka fish (*Oryzias latipes*) are affected by a short exposure to the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 253(July), 106329. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106329>
- Freeman, Z. N., Dorus, S., & Waterfield, N. R. (2013). The KdpD/KdpE Two-Component System: Integrating K⁺ homeostasis and virulence. *PLOS Pathogens*, 9(3), e1003201. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1003201>
- García-Márquez, J., Galafat, A., Vizcaíno, A. J., Barany, A., Martos-Sitcha, J. A., Mancera, J. M., Acien, G., Figueroa, F. L., Alarcón, F. J., Arijo, S., & Abdala-Díaz, R. T. (2022). Dietary use of the microalga *Chlorella fusca* improves growth, metabolism, and digestive functionality in thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*, Risso 1827) Juveniles. *Frontiers in Marine Science*, 9, 902203. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2022.902203>

- García de La Banda, I., Lobo, C., León-Rubio, J. M., Tapia-Paniagua, S., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., Moreno-Ventas, X., Lucas, L. M., Linares, F., Arce, F., & Arijó, S. (2010). Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*, 306(1–4), 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.008>
- Gibson, J. H., Hon, H., Farnood, R., Droppo, I. G., & Seto, P. (2009). *Effects of ultrasound on suspended particles in municipal wastewater*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.02.024>
- Gomez, D., Sunyer, J. O., & Salinas, I. (2013). The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1729–1739. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.032>
- Groisman, E. A. (2016). Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. *Annual Review of Microbiology*, 70(1), 103–124. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095331>
- Gupta, S., Lokesh, J., Abdelhafiz, Y., Siriappagounder, P., Pierre, R., Sørensen, M., Fernandes, J. M. O., & Kiron, V. (2019). Macroalga-derived alginate oligosaccharide alters intestinal bacteria of Atlantic Salmon. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02037>
- Harmon, G. S., Dumlao, D. S., Ng, D. T., Barrett, K. E., Dennis, E. A., Dong, H., & Glass, C. K. (2010). Pharmacological correction of a defect in PPAR- γ signaling ameliorates disease severity in Cfr-deficient mice. *Nature Medicine*, 16(3), 313–318. <https://doi.org/10.1038/nm.2101>
- Henderson, R. J., & Millar, R. M. (1998). Characterization of lipolytic activity associated with a *Vibrio* species of bacterium isolated from fish intestines. *Journal of Marine Biotechnology*, 6(3), 168–173. <https://europepmc.org/article/med/9701639>
- Hillebrand, H., Bennett, D. M., & Cadotte, M. W. (2008). Consequences of dominance: A review of evenness effects on local and regional ecosystem processes. *Ecology*, 89(6), 1510–1520. <https://doi.org/10.1890/07-1053.1>
- Hu, Y., Wang, Y., Li, A., Wang, Z., Zhang, X., Yun, T., Qiu, L., & Yin, Y. (2016). Effects of fermented rapeseed meal on antioxidant functions, serum biochemical parameters and intestinal morphology in broilers. *Food and Agricultural Immunology*, 27(2), 182–193. <https://doi.org/10.1080/09540105.2015.1079592>
- Ina-Salwany, M. Y., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F. A., Mohd-Aris, A., Amal, M. N. A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., & Zamri-Saad, M. (2019). Vibriosis in fish: A review on disease development and prevention. *Journal of Aquatic Animal Health*, 31(1), 3–22. <https://doi.org/10.1002/aah.10045>
- Inagaki, T., Moschetta, A., Lee, Y. K., Peng, L., Zhao, G., Downes, M., Yu, R. T., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Repa, J. J., Mangelsdorf, D. J., & Kliewer, S. A. (2006). Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), 3920–3925. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509592103>
- Itoi, S., Okamura, T., Koyama, Y., & Sugita, H. (2006). Chitinolytic bacteria in the intestinal tract of Japanese coastal fishes. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(12), 1158–1163. <https://doi.org/10.1139/w06-082>
- Jami, M., Ghanbari, M., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2015). Phylogenetic diversity and biological activity of culturable Actinobacteria isolated from freshwater fish gut microbiota. *Microbiological Research*, 175, 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.01.009>

- Jochum, L., & Stecher, B. (2020). Label or Concept – What Is a Pathobiont? *Trends in Microbiology*, 28(10), 789–792. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.04.011>
- Kim, P. S., Shin, N.-R., Lee, J.-B., Kim, M.-S., Whon, T. W., Hyun, D.-W., Yun, J.-H., Jung, M.-J., Kim, J. Y., & Bae, J.-W. (2021). Host habitat is the major determinant of the gut microbiome of fish. *Microbiome* 2021 9:1, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S40168-021-01113-X>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1–e1. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS808>
- Kortner, T. M., Björkhem, I., Krasnov, A., Timmerhaus, G., & Krogh, A. (2014). 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*, 111(12), 2089–2103. <https://doi.org/10.1017/S0007114514000373>
- Kousoulaki, K., Krasnov, A., Ytteborg, E., Sweetman, J., Pedersen, M. E., Høst, V., & Murphy, R. (2021). A full factorial design to investigate interactions of variable essential amino acids, trace minerals and vitamins on Atlantic salmon smoltification and post transfer performance. *Aquaculture Reports*, 20, 100704. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100704>
- Kurdi, P., Kawanishi, K., Mizutani, K., & Yokota, A. (2006). Mechanism of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*, 188(5), 1979–1986. <https://doi.org/10.1128/JB.188.5.1979-1986.2006>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Levy, M., Blacher, E., & Elinav, E. (2017). Microbiome, metabolites and host immunity. *Current Opinion in Microbiology*, 35, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.10.003>
- Lewis, V. G., Ween, M. P., & McDevitt, C. A. (2012). The role of ATP-binding cassette transporters in bacterial pathogenicity. *Protoplasma*, 249(4), 919–942. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0360-8>
- Li, G. Y., Li, J., Xiao, P., Guo, Y. H., & Mo, Z. L. (2011). Detection of type III secretion gene as an indicator for pathogenic *Edwardsiella tarda*. *Letters in Applied Microbiology*, 52(3), 213–219. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02984.x>
- Li, J., Fang, P., Yi, X., Kumar, V., & Peng, M. (2022). Probiotics *Bacillus cereus* and *B. subtilis* reshape the intestinal microbiota of Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. *Pengze*) fed with high plant protein diets. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1027641>
- Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F., & Wang, W. (2016). The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP24340>
- Liu, Y., Rzesutek, E., van der Voort, M., Wu, C.-H., Thoen, E., Skaar, I., Bulone, V., Dorrestein, P. C., Raaijmakers, J. M., & de Bruijn, I. (2015). Diversity of aquatic *Pseudomonas* species and their activity against the fish pathogenic *Oomycete saprolegnia*. *PLOS ONE*, 10(8), e0136241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136241>
- Lobo, C., Moreno-Ventas, X., Tapia-Paniagua, S., Rodríguez, C., Moriñigo, M. A., & de La Banda, I. G. (2014). Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in Senegalese sole larviculture. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(1), 295–309. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9844-0>

- Lozano, Y. M., & Rillig, M. C. (2020). Effects of microplastic fibers and drought on plant communities. *Environmental Science and Technology*, 54(10), 6166–6173. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01051>
- Lyons, P. P., Turnbull, J. F., Dawson, K. A., & Crumlish, M. (2017). Phylogenetic and functional characterization of the distal intestinal microbiome of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from both farm and aquarium settings. *Journal of Applied Microbiology*, 122(2), 347–363. <https://doi.org/10.1111/jam.13347>
- Lyons, Philip P., Turnbull, J. F., Dawson, K. A., & Crumlish, M. (2017). Effects of low-level dietary microalgae supplementation on the distal intestinal microbiome of farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 48(5), 2438–2452. <https://doi.org/10.1111/are.13080>
- Martínez, G., Shaw, E. M., Carrillo, M., & Zanuy, S. (1998). Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *BioTechniques*, 24(2), 238–239. <https://doi.org/10.2144/98242bm14>
- Meng, Y., Mu, L., Li, Y., Yu, M., Liu, H., Pan, Y., & Zhao, Y. (2023). Expression patterns and influence of the two-component system in *Vibrio parahaemolyticus* of different genotypes. *Gene*, 859, 147187. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147187>
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T. M., Bøgwald, J., Castex, M., & Ringø, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.007>
- Mikkelsen, H., Sivaneson, M., & Filloux, A. (2011). Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 13(7), 1666–1681. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02495.x>
- Milián-Sorribes, M. C., Martínez-Llorens, S., Cruz-Castellón, C., Jover-Cerdá, M., & Tomás-Vidal, A. (2021). Effect of fish oil replacement and probiotic addition on growth, body composition and histological parameters of yellowtail (*Seriola dumerili*). *Aquaculture Nutrition* 27(1), 3–16. <https://doi.org/10.1111/anu.13171>
- Minh Duc, P., Nay Myo, H., Thi Tuyet Hoa, T., Thanh Liem, P., Onoda, S., & Thi Thanh Hien, T. (2020). Effects of heat killed *Lactobacillus plantarum* (HK L-137) supplemental diets on growth, survival and health of juvenile striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 10(3), 761. <https://doi.org/10.29322/IJSRP.10.03.2020.p9993>
- Moriarty, D. (1998). Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164(1–4), 351–358. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00199-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00199-9)
- Mortensen, J. H., Lindholm, M., Langholm, L. L., Kjeldsen, J., Bay-Jensen, A. C., Karsdal, M. A., & Manon-Jensen, T. (2019). The intestinal tissue homeostasis - the role of extracellular matrix remodeling in inflammatory bowel disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 13(10), 977–993. <https://doi.org/10.1080/17474124.2019.1673729>
- Mougin, J., & Joyce, A. (2023). Fish disease prevention via microbial dysbiosis-associated biomarkers in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 15(2), 579–594. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12745>
- Mukherjee, R., Jow, L., Croston, G. E., & Paterniti, J. R. (1997). Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPAR γ 2 versus PPAR γ 1 and activation with retinoid x receptor agonists and antagonists. *Journal of Biological Chemistry*, 272(12), 8071–8076. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.12.8071>

- Muñoz-Atienza, E., Araújo, C., Lluch, N., Hernández, P. E., Herranz, C., Cintas, L. M., & Magadán, S. (2015). Different impact of heat-inactivated and viable lactic acid bacteria of aquatic origin on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) head-kidney leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 44(1), 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.021>
- Naya-Català, F., do Vale Pereira, G., Piazzon, M. C., Fernandes, A. M., Caldach-Giner, J. A., Sitjà-Bobadilla, A., Conceição, L. E. C., & Pérez-Sánchez, J. (2021). Cross-talk between intestinal microbiota and host gene expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles: insights in fish feeds for increased circularity and resource utilization. *Frontiers in Physiology*, 12(October), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.748265>
- Nayak, S. K. (2020). Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in aquaculture with special reference to *Bacillus subtilis*. *Reviews in Aquaculture*, 1–45. <https://doi.org/10.1111/raq.12503>
- Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A. A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J., & Austin, B. (2007). *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1699–1706. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03402.x>
- Nimalan, N., Sørensen, S. L., Fečkaninová, A., Koščová, J., Mudroňová, D., Gancarčíková, S., Vatsos, I. N., Bisa, S., Kiron, V., & Sørensen, M. (2023). Supplementation of lactic acid bacteria has positive effects on the mucosal health of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed soybean meal. *Aquaculture Reports*, 28, 101461. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101461>
- Noor, S. O., Ridgway, K., Scovell, L., Kemsley, E. K., Lund, E. K., Jamieson, C., Johnson, I. T., & Narbad, A. (2010). Ulcerative colitis and irritable bowel patients exhibit distinct abnormalities of the gut microbiota. *BMC Gastroenterology*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-10-134>
- Noureen, A., Jabeen, F., Wajid, A., Kazim, M. Z., Safdar, N., & Cappello, T. (2023). Natural bioactive phytochemicals to reduce toxicity in common carp *Cyprinus carpio*: A challenge to environmental risk assessment of nanomaterials. *Water (Switzerland)*, 15(6). <https://doi.org/10.3390/w15061152>
- Parada Venegas, D., De la Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H. J. M., Faber, K. N., & Hermoso, M. A. (2019). Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), 424615. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>
- Qi, X., Xue, M., Cui, H., Yang, K., Song, K., Zha, J., Wang, G., & Ling, F. (2020). Antimicrobial activity of *Pseudomonas monteilii* JK-1 isolated from fish gut and its major metabolite, 1-hydroxyphenazine, against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 526, 735366. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735366>
- Rasmussen, Jacob A., Kiilerich, P., Madhun, A. S., Waagbø, R., Lock, E. J. R., Madsen, L., Gilbert, M. T. P., Kristiansen, K., & Limborg, M. T. (2023). Co-diversification of an intestinal *Mycoplasma* and its salmonid host. *ISME Journal*, 17(5), 682–692. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01379-z>
- Rasmussen, Jacob Agerbo, Villumsen, K. R., von Gersdorff Jørgensen, L., Forberg, T., Zuo, S., Kania, P. W., Buchmann, K., Kristiansen, K., Bojesen, A. M., & Limborg, M. T. (2022). Integrative analyses of probiotics, pathogenic infections and host immune response highlight the importance of gut microbiota in understanding disease recovery in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Microbiology*, 132(4), 3201–3216. <https://doi.org/10.1111/jam.15433>
- Ray, A. K., Ghosh, K., & Ringø, E. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: A review. In *Aquaculture Nutrition*, 18(5), 465–492. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x>

- Ridlon, J. M., Kang, D. J., & Hylemon, P. B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. In *Journal of Lipid Research* 47(2), 241–259. <https://doi.org/10.1194/jlr.R500013-JLR200>
- Ridlon, J. M., Kang, D. J., Hylemon, P. B., & Bajaj, J. S. (2014). Bile acids and the gut microbiome. *Current Opinion in Gastroenterology*, 30(3), 332–338. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000057>
- Rimoldi, S., Terova, G., Ascione, C., Giannico, R., & Brambilla, F. (2018). Next generation sequencing for gut microbiome characterization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed animal by-product meals as an alternative to fishmeal protein sources. *PLOS ONE*, 13(3), e0193652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193652>
- Rohani, M. F., Islam, S. M., Hossain, M. K., Ferdous, Z., Siddik, M. A., Nuruzzaman, M., Padeniya, U., Brown, C., & Shahjahan, M. (2022). Probiotics, prebiotics and synbiotics improved the functionality of aquafeed: Upgrading growth, reproduction, immunity and disease resistance in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 120, 569–589. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.12.037>
- Romano, N., Kumar, V., Yang, G., Kajbaf, K., Rubio, M. B., Overturf, K., Brezas, A., & Hardy, R. (2020). Bile acid metabolism in fish: disturbances caused by fishmeal alternatives and some mitigating effects from dietary bile inclusions. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1792–1817. <https://doi.org/10.1111/raq.12410>
- Rombout, J. H. W. M., Abelli, L., Picchietti, S., Scapigliati, G., & Kiron, V. (2010). Teleost intestinal immunology. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(5), 616–626 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.001>
- Sáenz De Rodríguez, M. A., Díaz-Rosales, P., Chabrillón, M., Smidt, H., Arijo, S., León-Rubio, J. M., Alarcón, F. J., Balebona, M. C., Moriño, M. A., Cara, J. B., & Moyano, F. J. (2009). Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture Nutrition*, 15(2), 177–185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00581.x>
- Saleh, E. S. E., Tawfeek, S. S., Abdel-Fadeel, A. A. A., Abdel-Daim, A. S. A., Abdel-Razik, A. R. H., & Youssef, I. M. I. (2022). Effect of dietary protease supplementation on growth performance, water quality, blood parameters and intestinal morphology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 106(2), 419–428. <https://doi.org/10.1111/jpn.13591>
- Sarkar, S. (2018). Whether viable and dead probiotic are equally efficacious? *Nutrition and Food Science*, 48(2), 285–300. <https://doi.org/10.1108/NFS-07-2017-0151>
- Shaw, C., Hess, M., & Weimer, B. C. (2022). Two-component systems regulate bacterial virulence in response to the host gastrointestinal environment and metabolic cues. *Virulence*, 13(1), 1666–1680. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2127196>
- Shripada, R., Gayatri, A. J., & Sanjay, P. (2019). Paraprobiotics. *Precision Medicine for Investigators, Practitioners and Providers*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819178-1.00005-8>
- Standen, B., Peggs, D., Foey, A., Davies, S., Santos, G., & Merrifield, D. (2015). Dietary administration of a commercial mixed-species probiotic improves growth performance and modulates the intestinal immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 49, 427–435 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.037>
- Sultan, M., Arya, R., & Kim, K. K. (2021). Roles of Two-Component Systems in *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12152. <https://doi.org/10.3390/ijms222212152>

- Swann, J. R., Want, E. J., Geier, F. M., Spagou, K., Wilson, I. D., Sidaway, J. E., Nicholson, J. K., & Holmes, E. (2011). Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4523–4530. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006734107>
- Tapia-Paniagua, S., Lobo, C., Moreno-Ventas, X., de la Banda, I. G., Moriñigo, M. A., & Balebona, M. C. (2014). Probiotic supplementation influences the diversity of the intestinal microbiota during early stages of farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Marine Biotechnology*, 16(6), 716–728. <https://doi.org/10.1007/s10126-014-9588-6>
- Tapia-Paniagua, S. T., Fumanal, M., Anguís, V., Fernández-Díaz, C., Alarcón, F. J., Moriñigo, M. A., & Balebona, M. C. (2019). Modulation of intestinal microbiota in *Solea senegalensis* fed low dietary level of *Ulva ohnoi*. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00171>
- Taverniti, V., & Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: Proposal of paraprobiotic concept). *Genes and Nutrition*, 6(3), 261–274. <https://doi.org/10.1007/S12263-011-0218-X/FIGURES/1>
- Toledo Hijo, A. A. C., Silva, E. K., Cristianini, M., & Meirelles, A. J. A. (2023). High-intensity ultrasound assisted-emulsification using ionic liquids as novel naturally-derived emulsifiers for food industry applications. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 84, 103301 <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103301>
- Vizcaíno, A. J., López, G., Sáez, M. I., Jiménez, J. A., Barros, A., Hidalgo, L., Camacho-Rodríguez, J., Martínez, T. F., Cerón-García, M. C., & Alarcón, F. J. (2014). Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Aquaculture*, 431, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.010>
- Wahli, W. (2008). A gut feeling of the PXR, PPAR and NF-κB connection. *Journal of Internal Medicine*, 263(6), 613–619. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.01951.x>
- Wahli, Walter, & Michalik, L. (2012). PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(7), 351–363. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.001>
- Wang, C., Liu, Y., Sun, G., Li, X., & Liu, Z. (2019). Growth, immune response, antioxidant capability, and disease resistance of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed *Bacillus velezensis* V4 and *Rhodotorula mucilaginosa* compound. *Aquaculture*, 500, 65–74. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.09.052>
- Wang, L., Sagada, G., Wang, C., Liu, R., Li, Q., Zhang, C., & Yan, Y. (2023). Exogenous bile acids regulate energy metabolism and improve the health condition of farmed fish. *Aquaculture* 562, 738852. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738852>
- Wang, X.-Z., Jiang, W.-D., Feng, L., Wu, P., Liu, Y., Zeng, Y.-Y., Jiang, J., Kuang, S.-Y., Tang, L., Tang, W.-N., & Zhou, X.-Q. (2018). Low or excess levels of dietary cholesterol impaired immunity and aggravated inflammation response in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*, 78, 202–221. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.030>
- Wu, X., Teame, T., Hao, Q., Ding, Q., Liu, H., Ran, C., Yang, Y., Zhang, Y., Zhou, Z., Duan, M., & Zhang, Z. (2020). Use of a paraprobiotic and postbiotic feed supplement (HWF™) improves the growth performance, composition and function of gut microbiota in hybrid sturgeon (*Acipenser baerii* x *Acipenser schrenckii*). *Fish and Shellfish Immunology*, 104, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.054>

- Xiong, F., Wu, S.-G., Zhang, J., Jakovlić, I., Li, W.-X., Zou, H., Li, M., & Wang, G.-T. (2018). Dietary bile salt types influence the composition of biliary bile acids and gut microbiota in grass carp. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02209>
- Yajima, D., Fujita, H., Hayashi, I., Shima, G., Suzuki, K., & Toju, H. (2023). Core species and interactions prominent in fish-associated microbiome dynamics. *Microbiome*, 11(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01498-x>
- Yokota, A., Fukiya, S., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T., & Ishizuka, S. (2012). Is bile acid a determinant of the gut microbiota on a high-fat diet? *Gut Microbes*, 3(5), 455–459. <https://doi.org/10.4161/gmic.21216>
- Yoshimoto, S., Loo, T. M., Atarashi, K., Kanda, H., Sato, S., Oyadomari, S., Iwakura, Y., Oshima, K., Morita, H., Hattori, M., Honda, K., Ishikawa, Y., Hara, E., & Ohtani, N. (2013). Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*, 499(7456), 97–101. <https://doi.org/10.1038/nature12347>
- Yukgehnaish, K., Kumar, P., Sivachandran, P., Marimuthu, K., Arshad, A., Paray, B. A., & Arockiaraj, J. (2020). Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1903–1927. <https://doi.org/10.1111/raq.12416>
- Zheng, X., Duan, Y., Dong, H., & Zhang, J. (2017). Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* in different treatments on growth performance and immune gene expression of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under normal condition and stress of acute low salinity. *Fish & Shellfish Immunology*, 62, 195–201 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.01.015>

Material suplementario

Debido al tamaño y la resolución de algunas figuras, pueden ser descargadas en el siguiente enlace:

<https://zenodo.org/records/12706863?token=eyJhbGciOiJIUzUxMiJ9.eyJpZCI6IjA1ZWUyN2U2LTIwNGItNGI4Zi1hZjRmLTM3MzRiYTViMWYyNyIsImRhRG EiOnt9LCJyYW5kb20iOiI4YjU2NjhmOTUyZDRjOGMzMzMGVhYjZiMjgzMTRIO DZjNyJ9.C7EjLW2xJeOKLBsidPoEFwfFyGW4pkLaBC787idu3GuddN-m3B25a7LLVMFcQ5T6dKSybZwrsqoJ3WZjAtRzPg>

A continuación, se indica el título de cada una de las figuras en español.

Figura Suplementaria 1. Mapa KEGG del análisis de la vía del metabolismo primario de los ácidos biliares. Los genes que muestran una sobreexpresión significativa están coloreados en rojo, mientras que los que muestran represión están marcados en verde.

Figura Suplementaria 2. Mapa KEGG del análisis de la vía de señalización PPAR. Los genes que muestran una sobreexpresión significativa están coloreados en rojo, mientras que los que muestran represión están marcados en verde.

Figura Suplementaria 3. Mapa KEGG del análisis de la vía de interacción ECM-Receptor. Los genes que muestran una sobreexpresión significativa están coloreados en rojo, mientras que los que muestran represión están marcados en verde.

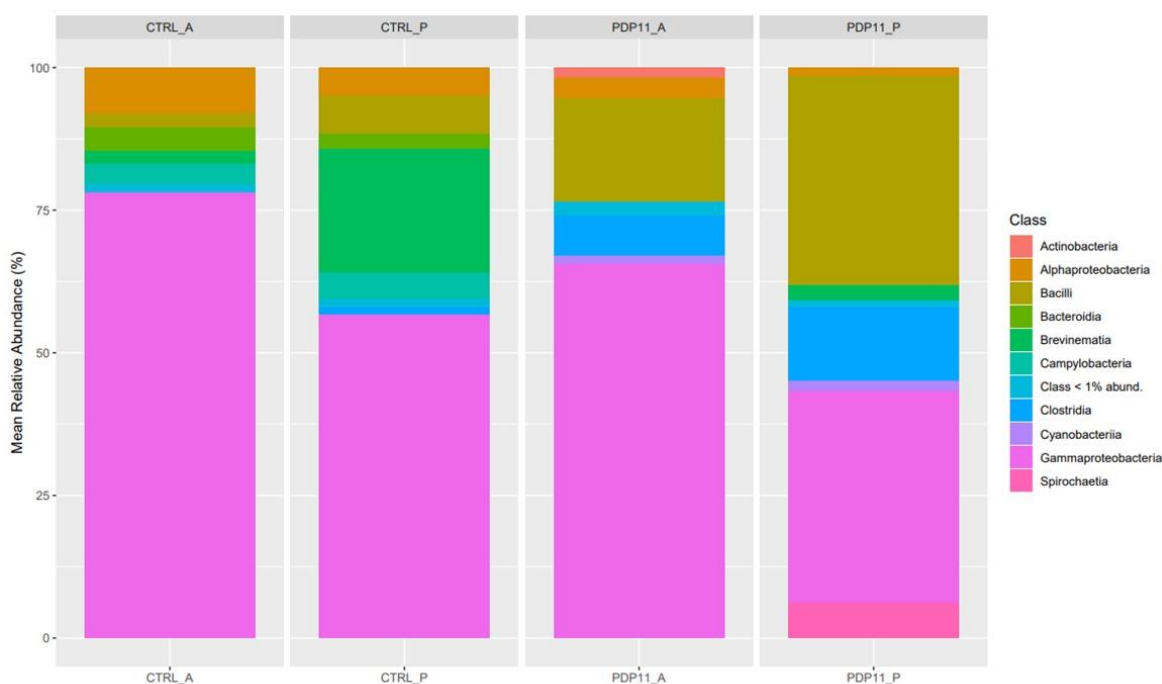


Figura Suplementaria 4. Diagrama de barras de las abundancias relativas medias a nivel de clase en el tracto gastrointestinal de *S. senegalensis* alimentado con dieta control (CTRL) y suplementada con SpPdp11 (Pdp11) con secciones etiquetadas como A (anterior) y P (posterior). Los valores inferiores al 1% se indican como Class < 1% de abundancia.

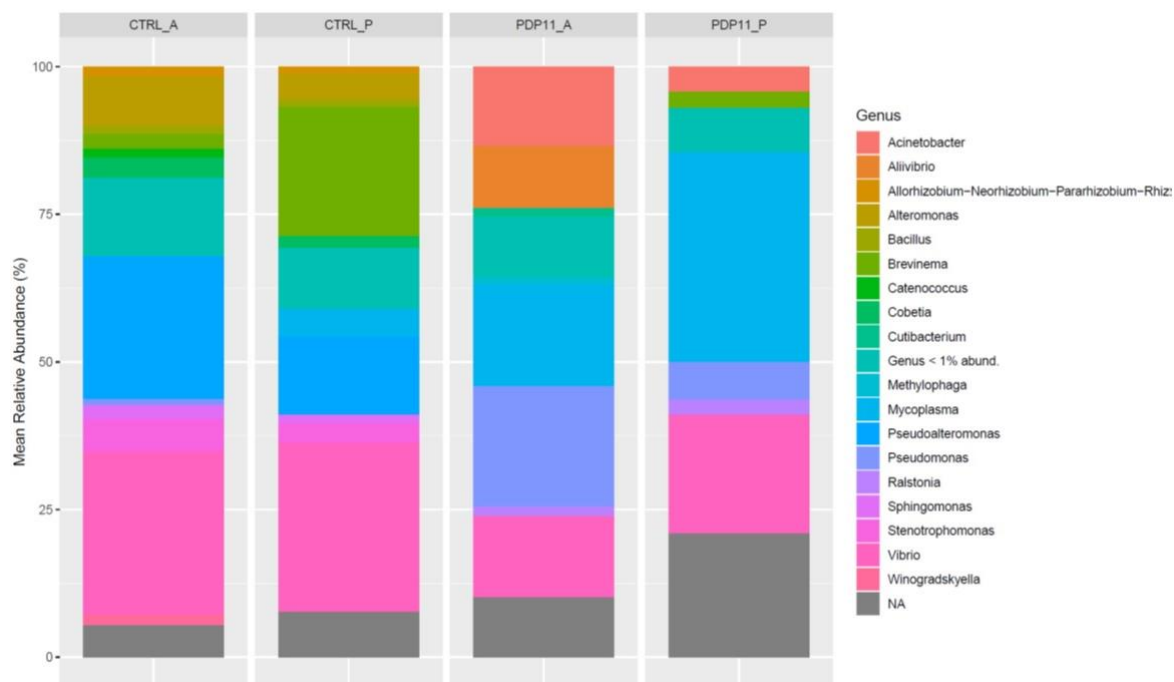


Figura Suplementaria 5. Diagrama de barras de las abundancias relativas medias a nivel de género en el tracto gastrointestinal de *S. senegalensis* alimentado con dieta control (CTRL) y suplementada con SpPdp11 (Pdp11) con secciones etiquetadas como A (anterior) y P (posterior). Los valores inferiores al 1% se indican como Genus < 1% de abundancia.

Figura Suplementaria 6. Tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LEfSe) realizado en las comunidades bacterianas a nivel de género entre la comparación anterior (A) y posterior (P) entre el control alimentado (CTRL) y el alimentado con suplementación sonicada de SpPdp11 (PDP11). El gradiente de color explica el % de abundancia del género en el grupo.

Discusión general





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Discusión general

La dieta se ha considerado un factor fundamental para la salud de los animales desde hace tiempo, pero ha sido con las recientes investigaciones sobre la microbiota asociada a los organismos cuando se ha comenzado a comprender el papel o el impacto que la dieta tiene sobre la composición y función de la microbiota en el hospedador (Tremaroli y Bäckhed, 2012). Las tecnologías de secuenciación masiva y los avances en bioinformática permiten examinar la diversidad de estas comunidades microbianas y proporcionar información sobre los posibles efectos en el hospedador. No obstante, el conocimiento acerca de la microbiota de los organismos acuícolas está muy por detrás del relativo a humanos y algunos mamíferos, y la información que se tiene muestra que la microbiota difiere significativamente de la de otros vertebrados (Ringø y col., 2016).

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo avanzar en el conocimiento molecular del impacto de las dietas funcionales en la microbiota asociada a las mucosas y la respuesta de expresión transcripcional de los tejidos subyacentes de dos especies de peces de gran interés comercial, como son la dorada y el lenguado senegalés. En esta investigación se ha abordado el estudio de los efectos de dietas funcionales suplementadas con algas, tanto microscópicas como macroscópicas (*Nannochloropsis gaditana*, *Nannochloropsis* sp. y *Ulva ohnoi*), y bacterias (*Arthrospira* sp. y *Shewanella putrefaciens* SpPdp11) en diversos aspectos de la fisiología del hospedador. Este enfoque ha permitido, no solo ampliar la comprensión de los efectos de distintas dietas funcionales en la salud de los animales, sino también proporcionar una perspectiva más profunda de los mecanismos moleculares que subyacen a estos procesos.

1. Efecto de dietas funcionales con microorganismos para *Sparus aurata*

1.1. ¿Se ve afectada la microbiota asociada a las mucosas de dorada por la alimentación con dietas funcionales suplementadas con microalgas y bacterias?

Las microalgas tienen un gran potencial como aditivos en la alimentación de los peces dada la cantidad de compuestos bioactivos identificados en ellas (Siddik y col., 2024). Aunque su producción sigue siendo económicamente costosa, ésta se ve compensada por los beneficios que estos compuestos pueden proporcionar a los animales, incluso a bajos niveles de inclusión. Por ende, su uso como aditivo funcional está generando un interesante campo de investigación que va más allá de promover el crecimiento del pez, y que engloba la mejora del estado de salud (Bahi y col., 2023; Bharathi y col., 2019). No obstante, la digestibilidad de algunas microalgas, con paredes celulares de polisacáridos complejos y lípidos difíciles de digerir, depende de factores como el tipo y la cantidad de biomasa presente, así como de la producción enzimática y las características físico-químicas del tracto digestivo del animal en cuestión (Annamalai y col., 2021; Niccolai y col., 2019). Por esta razón, procesos como la hidrólisis enzimática resultan beneficiosos, ya que se ha observado que las microalgas hidrolizadas enzimáticamente pueden mejorar aspectos fisiológicos en peces incluso a bajos niveles de inclusión (Agboola y col., 2019; Galafat y col., 2020).

Partiendo de esta premisa, en esta Tesis Doctoral, se ha evaluado el efecto de la inclusión de un 5% de *N. gaditana* hidrolizada en el pienso de *Sparus aurata* (Capítulo 1). El estudio, que se centró en la mucosa intestinal, indicó que dicha inclusión no provocaba cambios significativos en los índices de alfa diversidad de la microbiota intestinal. Esto está en concordancia con estudios previos con nutracéuticos, en los que al incluir concentraciones de 0,5% de aceites esenciales de ajo, tomillo y orégano en la dieta de *S. aurata*, no se encontraron variaciones en los índices de alfa diversidad de la microbiota intestinal (Firmino y col., 2020), presentando unos valores muy similares a los obtenidos en nuestro estudio.

No obstante, aunque la diversidad alfa no varió significativamente, existen estudios que muestran variaciones significativas en la composición de la microbiota intestinal de dorada cuando se incorporan pequeñas cantidades de aditivos a la dieta, como el 3% de plasma porcino (Tapia-Paniagua y col., 2020) o levaduras como *Debaryomyces hansenii* (Sanahuja y col., 2023), aunque en ninguno

de los casos llegó a darse una sintomatología compatible con una disbiosis en el animal. En nuestro estudio, la adición de un 5% de *N. gaditana* hidrolizada a la dieta de dorada tampoco produjo modificaciones significativas en la composición bacteriana del intestino de *S. aurata*, ni en la posible función que ésta podría ejercer. Dicha estabilidad puede interpretarse como positiva, considerando que los peces del grupo control presentaban un estado de salud óptimo y su microbiota, similar a la del grupo experimental, estaba en equilibrio. Asimismo, se ha demostrado que la inclusión dietética de un 5% de *N. gaditana* hidrolizada mejora la morfología y fisiología del intestino (Sáez y col., 2022), además de mejorar el perfil de ácidos grasos en el músculo, estimular la producción de fibras musculares, (Ayala et al., 2023; Sáez et al., 2023) y mejorar el estado oxidativo de los lípidos (Molina-Roque y col., 2022).

. Por tanto, el uso de hidrolizados enzimáticos parece ofrecer los beneficios de la inclusión de estos compuestos sin hidrolizar, sin provocar una alteración brusca en la microbiota intestinal, aunque sería necesario realizar un mayor número de ensayos para corroborarlo.

Nuestros resultados confirman lo enunciado por Ruiz y col. (2023), que proponen que un cambio en la dieta de dorada tiene menor peso en la modulación de la microbiota intestinal que otros factores inherentes al hospedador, y que siempre que se pruebe el impacto de los alimentos en la salud y la calidad de los peces a largo plazo, la mayor parte de la microbiota intestinal se adaptará y persistirá a pesar de la influencia de la dieta. También se debe considerar que los piensos utilizados actualmente son de alto valor nutricional, lo que favorece una microbiota intestinal saludable, promoviendo una barrera intestinal estable y, por tanto, más resiliente a los cambios. Además, las inclusiones estudiadas en este trabajo son en porcentajes inferiores al 15%, que no pretenden sustituir la harina de pescado, sino actuar como nutracéuticos, aportando beneficios a través de una baja inclusión. Estos factores favorecen una mayor capacidad para mantener una microbiota intestinal estable incluso frente a modulaciones en la alimentación.

La piel y las branquias constituyen, junto con el intestino, las grandes superficies mucosas del pez. En condiciones de cría, donde el estrés, la alta densidad poblacional y el riesgo de lesiones puede ser mayor, resulta fundamental fortalecer de manera efectiva estas barreras de intercambio y de defensa.

Distintos autores han establecido estrategias que permiten reforzar la funcionalidad de estos órganos, como incrementar la inmunidad (Cerezuela y col., 2016), la cicatrización (Chen y col., 2020) o la producción de *mucus* (Mansour y col., 2020), todo ello, modificando o añadiendo nuevos componentes a la dieta. El uso de microorganismos puede proporcionar numerosos componentes beneficiosos como vitaminas, antioxidantes o inmunoestimulantes (Bharathi y col., 2019) y estos procesos pueden ser diferentes a los que ocurren en el intestino. Bledsoe y col. (2022) estudiaron en salmón común (*Salmo salar*) la acción de dietas funcionales basadas en manano-oligosacáridos o aceite de coco. Estos autores encontraron una falta de impacto general de la dieta en la microbiota intestinal que, sin embargo, producía diferencias significativas entre la riqueza de las distintas comunidades microbianas de branquias o piel, siendo en esta última donde se detectaron mayores cambios en la composición filogenética según la dieta usada.

En esta Tesis se ha querido comprobar la interacción que existe entre el intestino y la piel o branquias en peces y, si el uso de componentes beneficiosos en la dieta podría influir en esta interacción. Para ello, se realizaron experimentos con una suplementación al 10% de *Nannochloropsis* sp. y *Arthrospira* sp. (Capítulo 2) o con una dieta probiótica con SpPdp11 (Capítulo 3). Entre ambos estudios, se observaron variaciones en los valores control de los índices de diversidad alfa de la microbiota asociada a la piel. En los experimentos con microalgas y cianobacterias, las doradas adultas ($182,5 \pm 1,8$ g) mostraron valores de diversidad superiores a los individuos juveniles ($21,8 \pm 0,9$ g) que recibieron la dieta probiótica. La edad y el peso son factores influyentes, que modifican la estructura de la epidermis, incrementando el número, tamaño y actividad de las células mucosas (Wilkins y Jancsar, 1979). Se ha observado que en otros animales la composición microbiana de la piel o las branquias varía a medida que aumenta el peso corporal (Rosado y col., 2021; Wu y col., 2020).

Estas variaciones en la diversidad también pueden deberse a las diferentes condiciones de cultivo utilizadas en los experimentos. El ensayo de alimentación con microalgas y cianobacterias (Capítulo 2) se desarrolló en el Laboratorio de Cultivos Marinos de Cádiz utilizando tanques con un sistema con circuito abierto, en contraste con los peces que recibieron la dieta probiótica (Capítulo 3), que fueron criados en las instalaciones para peces marinos de la Universidad de Murcia, utilizando circuitos cerrados. La composición del agua es clave para la comunidad asociada a las mucosas externas, ya que se encuentran en constante

interacción (Chiarello y col., 2019; Schmidt y col., 2015; Tarnecki y col., 2019). Côté y col. (2022) observaron que en *Gobio occitaniae*, la composición de la microbiota cutánea no se correlacionaba con la edad del hospedador, pero sí con la presencia de materia orgánica en suspensión, mostrando una mayor diversidad taxonómica y filogenética en entornos altamente eutróficos que sugieren un mayor acceso de nutrientes a los microorganismos. En consecuencia, que los resultados obtenidos en ambos experimentos muestren marcadas diferencias en la microbiota asociada a la piel de dorada sería compatible con las distintas etapas de desarrollo y condiciones de cultivo.

Quero y col. (2023) identificaron conexiones entre las poblaciones microbianas de los tejidos de dorada y su entorno, pero también demostraron la existencia de un núcleo o “core” de microorganismos asociados a los tejidos del animal que difiere de la comunidad microbiana presente en el entorno ambiental. Este hallazgo, respaldado por investigaciones previas (Berggren y col., 2022; Chiarello y col., 2015; Legrand y col., 2018; Sylvain y col., 2020), confirma que la composición de la microbiota depende, en gran medida de su hospedador, y viene determinada por su genética (producción y características del mucus, actividad del sistema inmunitario, etc.), así como por las características intrínsecas de cada especie (alimentación o propiedades físico-químicas de sus superficies en contacto con el exterior).

En el estudio de alimentación con *Nannochloropsis* sp. y *Arthrospira* sp. (Capítulo 2), esta premisa sirvió como fundamento para realizar los análisis interactómicos entre los microorganismos asociados a la piel y las branquias de dorada, ya que, de forma general, no se observaron grandes cambios entre los taxones bacterianos en las mucosas de los peces alimentados con la dieta funcional en comparación con los controles. Al ampliar el filtrado, las redes de coocurrencia se formaron con aquellos microorganismos más abundantes y recurrentes en todas las muestras. Estas relaciones entre las especies microbianas son influenciadas por diversos factores, como la fuente de nutrientes, metabolitos y macromoléculas derivadas tanto de la microbiota endógena como de las células del hospedador, así como a la exposición al ambiente exógeno, lo que genera una red densa de interacciones complejas. En nuestros resultados observamos que los patrones de coocurrencia estuvieron influenciados por características conservadas en niveles taxonómicos bacterianos más altos (desde niveles de género hasta niveles de filo), asumiendo una equivalencia funcional entre taxones similares (Riera y Baldo, 2020). En este contexto, se destacó el papel de *Polaribacter*

y *Acinetobacter* como microorganismos clave en el equilibrio de la microbiota branquial en dorada, que hasta el momento no se había comunicado. En la piel, *Acinetobacter* fue considerado como un género conector entre los módulos de las redes estudiadas, independientemente de la dieta analizada, pudiendo realizar labores de estabilidad y cooperación con otros grupos bacterianos. Este mismo género también formaba parte del núcleo bacteriano de la microbiota de piel de los todos los grupos ensayados en el experimento con alimentación probiótica (Capítulo 3), en el que tampoco se observaron diferencias significativas entre los tratamientos estudiados. Si bien existen herramientas para inferir redes de interacción, tanto dirigidas como no dirigidas, a partir de estudios transversales y longitudinales, aún se requiere de una investigación continua para mejorar la precisión de las interacciones microbianas previstas y, de esta manera, allanar el camino hacia enfoques más novedosos y precisos.

En resumen, la microbiota asociada a las mucosas de la dorada se ve afectada por la alimentación con dietas funcionales suplementadas con microalgas y bacterias de manera específica y dependiendo del tejido considerado. En el caso del intestino, la inclusión de un 5% de *N. gaditana* hidrolizada en la dieta de *S. aurata* no provoca cambios significativos en la diversidad alfa ni en la composición bacteriana, manteniendo una microbiota intestinal estable y en equilibrio. Por otro lado, cuando se incluyen suplementos de microalgas o bacterias, sí se observan variaciones en la microbiota de la piel, sugiriendo que estas dietas funcionales pueden modificar la microbiota de las mucosas externas más que la del intestino.

1.2. ¿Las dietas funcionales ensayadas producen cambios en la integridad de las superficies mucosas?

Debido a la estrecha interconectividad y bidireccionalidad de las interacciones microorganismo-hospedador, es difícil distinguir si cualquier alteración de la composición de la microbiota es causa o consecuencia. Las comunidades microbianas alteradas pueden mediar en el daño tisular y/o la inflamación en una variedad de tejidos (Ruff y col., 2020). Así mismo, daños en el tejido, en sus uniones o en las sustancias secretadas y excretadas por las células pueden tener consecuencias sobre la microbiota que hay en su superficie (Cámara-Ruiz y col., 2021).

En el ensayo con la dieta suplementada con *N. gaditana* (Capítulo 1), se realizó un estudio de la expresión de genes relacionados con la permeabilidad y estabilidad

de la barrera intestinal, sin encontrar variaciones significativas entre las distintas secciones intestinales y las dietas administradas. Sin embargo, para explorar el conjunto de los transcritos obtenidos por la adición probiótica a la dieta en la piel (Capítulo 3) se utilizaron técnicas de RNA-seq, que permitió un enfoque más amplio, pudiéndose observar que el grupo alimentado con el probiótico, reprimía genes de cicatrización temprana, por lo que se encontraba en una fase de curación de la herida más avanzada. Ambas técnicas tienen ventajas y desventajas (Nonis y col., 2014) y su utilización fue dependiente de los objetivos y de los recursos disponibles en ese momento.

La transcripción génica en la piel de dorada también ha sido evaluada tras el empleo de otras dietas funcionales. Por ejemplo, la adición de arginina al 1% redujo la expresión de genes asociados con la inflamación y aumentó la de genes relacionados con la re-epitelización tras una lesión cutánea (Chen y col., 2020). Así mismo, se observaron mejoras en la expresión de genes relacionados con propiedades antioxidantes tanto en la piel como en las branquias de doradas alimentadas con dietas suplementadas con *Moringa oleífera* (Mansour y col., 2020). El análisis del perfil transcripcional de la piel de dorada sana reveló una activación de la vía secretora en respuesta a la administración dietética de diferentes fitógenos, sugiriendo una estimulación en el reclutamiento de células fagocíticas (Firmino y col., 2021). No obstante, en nuestro estudio, al igual que en el caso de la microbiota de estos mismos especímenes, la inclusión dietética del 5% de *N. gaditana* hidrolizada no dio lugar a cambios significativos en la expresión de genes relacionados con la inmunidad y la integridad de la barrera intestinal. Estos resultados son similares a los obtenidos con *N. gaditana* cruda (15 g/kg) por Jorge y col., (2019), o con otras especies algales como *U. rigida* y *Gracilaria cornea* (Vizcaíno y col., 2016).

A pesar de las diferencias que existen entre el intestino y la piel, estudios realizados en seres humanos muestran que personas con enfermedad inflamatoria intestinal tienen un mayor riesgo de sufrir enfermedades inflamatorias de la piel y viceversa (Kim y col., 2017; Wu y col., 2017). Aunque el mecanismo responsable de dicha interferencia inmunitaria sigue siendo en gran medida desconocido, se ha planteado la hipótesis de que existe una señal entre el intestino y la piel que produce la alteración de la homeostasis inmunitaria en superficies epiteliales distantes (Greuter y col., 2017; Salem y col., 2018). En humanos, el uso de probióticos ha sido ampliamente considerado para la mejora de daños cutáneos (Sinha y col., 2021) e incluso en la cicatrización de heridas y la

prevención de infecciones cuando se administran antes y después de la cirugía (Fijan y col., 2019). Por ejemplo, se ha observado que lisados de cepas de *Lactobacillus rhamnospus* GG y *L. reuteri* promueven la re-epitelización de las monocapas de queratinocitos en humanos, mientras que los lisados de otros lactobacilos analizados (*L. plantarum* y *L. fermentum*) no tienen ningún efecto sobre esta re-epitelización (Mohammedsaeed y col., 2015).

En esta Tesis, hemos podido observar esta misma acción tras la administración de una dieta con probióticos en peces, que respalda el efecto beneficioso de los mismos a nivel sistémico, un aspecto muy poco explorado en estos animales. En nuestro estudio, la inclusión del probiótico vivo SpPdp11 en la dieta de *S. aurata* promovió una mejora en la curación de la herida cutánea, regulando genes relacionados con un estado de cicatrización más avanzado que en los individuos alimentados con la dieta basal. Otros estudios con microorganismos potencialmente probióticos, han mostrado mejoras en la barrera cutánea de dorada, como la inclusión en la dieta de un 1,1% de *D. hansenii*, que moduló genes relacionados con la inmunidad innata, funciones de transporte celular y de unión de anclaje que refuerzan la defensa física de la piel (Sanahuja y col., 2023), o la arquea *Halobacterium salinarum* al 0,1%, mostrando propiedades inmunoestimulantes en la piel (Messina y col., 2023).

Estos resultados apoyan el uso de dietas funcionales probióticas para modular la transcripción génica de la piel de dorada, con un efecto más pronunciado que el que se ha podido observar a nivel intestinal con dietas con un bajo contenido en algas.

2. Inclusión de *Ulva ohnoi* o SpPdp11 como paraprobiótico en dietas funcionales de *Solea senegalensis*

2.1. ¿Se ve alterada la microbiota intestinal del lenguado senegalés tras la alimentación con estas dietas funcionales?

Las macroalgas verdes (*Chlorophyta*) comprenden una fracción minoritaria (<1%) de la producción total de algas, aun siendo ricas en proteínas sulfatadas, aminoácidos, clorofilas y carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados, minerales y vitaminas con efectos medicinales y promotores de la salud (Moreira y col., 2022). Por otro lado, la utilización de microorganismos no viables busca superar el problema que representa el almacenamiento y la seguridad asociados a las

células vivas en productos probióticos, sin perder gran parte de los beneficios aportados (Akter y col., 2020).

Las peculiaridades del tracto digestivo del lenguado, una especie carnívora con limitada capacidad de digestión ácida, en un estómago pequeño, y con una importante hidrólisis alcalina en su largo intestino, hacen que las dietas deban ser formuladas de forma particular para esta especie (Yúfera y Darías, 2007). Se han probado numerosas dietas que incorporan fuentes de proteínas vegetales diversas, obteniéndose resultados prometedores a nivel de crecimiento, lo que indicaría la capacidad del *S. senegalensis* para modular la secreción de proteasas digestivas cuando la fuente proteica se ve modificada (Cabral y col., 2013; Silva y col., 2010; Valente y col., 2011). Sin embargo, esto no implicaría la ausencia de una modificación en su microbiota intestinal asociada a los cambios en la dieta, ya que, en este sentido, la investigación en *S. senegalensis* es limitada.

Aunque los ejemplares a los que se les administró la dieta con *U. onhoi* partían de un peso inicial menor ($12,3 \pm 2$ g) y un periodo de alimentación de 90 días (Capítulo 4), que aquellos que ingirieron la dieta con el microorganismo en forma de paraprobiótico durante 45 días (peso inicial de 105 ± 5 g, Capítulo 5), los resultados de la microbiota intestinal de ambos casos presentaron información interesante para discutir.

Almeida y col., (2023) proponen que los índices de alfa diversidad de la microbiota de lenguado no están influidos por las diferentes fases de crecimiento. Sin embargo, en el experimento con el pienso de lenguado suplementado con *U. ohnoi*, se observaron unos valores de diversidad alfa en los ejemplares control muy por debajo de los encontrados en el estudio con el paraprobiótico. Aunque se parte de diferentes dietas y estadios de desarrollo, una de las razones principales que dificulta su comparación puede radicar en el análisis bioinformático empleado. En el primer caso, se llevó a cabo una agrupación mediante unidades taxonómicas operativas (OTU) y la base de datos Greengenes (2013), mientras que en el segundo caso se utilizaron variantes de secuencia de amplicón (ASV) y la base de datos SILVA (2021). En comparación con las OTU, que pueden subestimar los valores de diversidad, los datos obtenidos a partir de los ASV generados por el paquete de R DADA2 proporcionan mayor sensibilidad al obtener las tablas de abundancia (Prodan y col., 2020). No obstante, estas variaciones metodológicas, no suponen un cambio considerable en la clasificación taxonómica de los taxones mayoritarios (Chiarello y col., 2022).

En cuanto a los efectos de las dietas funcionales, la inclusión de un 5% de *U. ohnoi* no tuvo un efecto significativo en los índices de riqueza o diversidad. Por el contrario, la inclusión de SpPdp11 sonificado provocó una disminución significativa en los índices de diversidad en ambos casos. En concordancia con estos resultados, el uso de paraprobióticos de *Rhodotorula minuta* y *Cetobacterium somerae* en esturiones híbridos también disminuyó significativamente los valores de diversidad alfa de la microbiota asociada a la mucosa intestinal (Wu y col., 2020). Por otra parte, en ambos casos, la inclusión de la dieta funcional en el lenguado senegalés modificó la microbiota intestinal separando de forma significativa las muestras en la representación de la diversidad beta. En el caso de los peces alimentados con la dieta con *U. ohnoi*, la modulación de la microbiota sólo se observó en la parte posterior del intestino. Es notable que esta clara separación no se produjera en el estudio realizado en dorada (Capítulo 1), donde la inclusión de la microalga *N. gaditana* hidrolizada no resultó en ningún tipo de alteración en la microbiota intestinal de la dorada, y por ende en los parámetros de diversidad estudiados.

En cuanto a los taxones observados en la microbiota intestinal de *S. senegalensis* alimentados con una dieta suplementada *U. ohnoi* o el paraprobiótico SpPdp11, *Proteobacteria* fue el filo dominante, al igual que en numerosas especies de peces de interés acuícola (Ghanbari y col., 2015). En el intestino anterior de todas las muestras de lenguado estudiadas existió una predominancia casi completa de microorganismos pertenecientes al filo *Proteobacteria* (entre un 70 al 90%), mientras que en la parte posterior este porcentaje fue menor. En el intestino posterior de los individuos que recibieron la dieta con el paraprobiótico (Capítulo 5), este porcentaje bajó hasta un 45%, muy inferior al de los individuos control de ese mismo experimento (~60%), o de los que recibieron la dieta con *U. ohnoi* (~70%) (Capítulo 4). Seguidamente, en el experimento de alimentación con el paraprobiótico SpPdp11, la dieta experimental mostró una mayor proporción del filo *Firmicutes* que el grupo control (5%-25%), representando aproximadamente un 25% en la parte anterior del intestino y un 60% en la parte posterior, aunque existía una gran dispersión entre las réplicas. A su vez, en los lenguados alimentados con un 5% de *U. ohnoi*, el porcentaje fue bajo (1,5%) y aumentó ligeramente en la parte posterior del grupo con *Ulva* (3%). Este cambio en la proporción *Proteobacteria/Firmicutes* se ha observado en otros estudios, donde la inclusión de dietas con alto contenido vegetal suplementadas con butirato de sodio en doradas mostró una disminución de *Proteobacteria* en favor de *Firmicutes* (Piazzon y col., 2017). Asimismo, en dietas ricas en vegetales, se

favoreció el crecimiento de bacterias del filo *Firmicutes* productoras de butirato a partir de polisacáridos complejos, lo que proporciona funciones beneficiosas para el hospedador (Apper y col., 2016; Desai y col., 2012), debido a que el butirato juega un papel importante en la regulación de la permeabilidad intestinal y posee efectos antiinflamatorios (Piazzon y col., 2017).

La abundancia del filo *Spirochaetes* fue de entre 13,5 a 13,7 % en la parte posterior del intestino de todos los ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con la dieta adicionada con un 5% de *U. ohnoi*, y para el grupo que recibió la dieta paraprobiótica el valor fue muy variable entre ejemplares, con una media de un 20%. Domínguez-Maqueda y col. (2021) observaron este filo como predominante en la parte posterior del intestino de lenguado senegalés independientemente del tratamiento estudiado.

A nivel de género, existe un papel predominante de *Vibrio* en la microbiota de *S. senegalensis* (Almeida y col., 2023). La dieta suplementada con un 5% de *U. ohnoi* aumentó la abundancia de *Vibrio* de forma significativa con respecto al grupo control. Este género, conocido por su contribución a la digestión mediante la producción de enzimas hidrolíticas como celulasa y amilasa (Ray y col., 2012), también muestra variaciones según la dieta en peces carnívoros (Egerton y col., 2018). Sin embargo, aunque *Vibrio* formó parte del núcleo de bacterias predominantes en el experimento donde se probó la dieta paraprobiótica, no se observaron variaciones entre tratamientos. Aun así, la utilización del paraprobiótico produjo una disminución significativa de géneros del filo *Proteobacteria* y el aumento de otros, como *Pseudomonas* en el intestino anterior y *Mycoplasma* en el posterior. La abundancia de *Mycoplasma* se ha asociado con una mejor salud de los salmónidos (Bozzi y col., 2021) y un incremento de vitamina B en la trucha arcoíris (Rasmussen y col., 2022).

Las variaciones entre géneros inducidos por la dieta paraprobiótica se tradujo en una alteración mínima de la funcionalidad inferida de la misma, regulándose principalmente los genes del sistema de dos componentes (TCS) en ambas secciones del intestino. La formación de biopelículas y los transportadores ABC se incrementaron en la microbiota del intestino anterior y disminuyeron en el posterior. El aumento de TCS está relacionado con la formación de biopelículas, lo cual se podría asociar con el aumento de *Pseudomonas* en el intestino posterior de estos ejemplares (Sultan y col., 2021). La represión de genes relacionados con los transportadores ABC en la microbiota del intestino posterior, que forman parte del movimiento de compuestos del medio extracelular al citoplasma,

podría estar ligada a la reducción de las proteobacterias, pues estos genes son fundamentales en la biogénesis de los lipopolisacáridos (LPS) de la pared celular (Lewis y col., 2012).

Por último, en los estudios de esta Tesis no se observaron diferencias significativas en la funcionalidad de la microbiota de la sección anterior del intestino de los lenguados que recibieron la dieta con *U. ohnoi*. Sin embargo, al igual que ocurrió con la composición de la microbiota, el estudio de predicción funcional indicó un incremento en la abundancia de genes relacionados con la degradación de xenobióticos y menor abundancia de aquéllos relacionados con la degradación de beta-lactamasas. Al igual que señalan algunos autores, en ambos casos pueden considerarse características deseables para la microbiota de los peces por su contribución a la degradación de compuestos presentes en los alimentos de origen vegetal y a la menor presencia de resistencias a antibióticos (Kokou y col., 2020; Tarnecki y col., 2019).

Por lo tanto, estos hallazgos indican que las dietas funcionales estudiadas tienen un impacto considerable en la microbiota intestinal del lenguado senegalés. Se observó que la inclusión de *U. ohnoi* no afectó significativamente los índices de diversidad, pero provocó cambios en la abundancia de ciertos taxones, mientras que la dieta con el paraprobiótico SpPdp11 resultó en una disminución significativa en los índices de diversidad y una modulación importante en la composición taxonómica de la microbiota, destacando un aumento en la proporción de *Firmicutes*.

2.2. ¿Modifica el tejido intestinal la inclusión de *U. ohnoi* o el paraprobiótico SpPdp11 en la dieta de *S. senegalensis*?

Aunque se produjeron alteraciones en la microbiota intestinal de lenguado senegalés alimentado con las dietas funcionales estudiadas, éstas no afectaron a la integridad intestinal de estos animales. En el caso de los individuos alimentados con la dieta paraprobiótica (Capítulo 5), los análisis histológicos mostraron una mejora en el tejido intestinal, evidenciando propiedades antiinflamatorias y una mayor eficacia en la absorción de nutrientes en los peces que recibieron la dieta experimental en comparación con los ejemplares alimentados con la dieta de control. De igual manera, en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), la suplementación dietética con una combinación de enzimas exógenas y el probiótico *Sanolife* (que contiene *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* y *B. pumilus*) mejoró el crecimiento y la morfología intestinal, pero

no se observaron cambios en el contenido del microbioma bacteriano intestinal, aunque su estudio se basó en la microbiota asociada a las heces, por lo que no se pueden descartar posibles efectos dietéticos (Adeoye y col., 2016). En cambio, en un estudio con palometa (*Trachinotus ovatus*), la sustitución total del aceite de pescado de su dieta por aceite de soja provocó una alteración en su microbiota intestinal, además de un deterioro de la función intestinal, detectado por la disminución de la altura y número de los pliegues intestinales, así como la disminución de enzimas digestivas (You y col., 2019). Es por ello que, para examinar una dieta funcional es crucial evaluar todos los cambios que se producen en el organismo, evitando que las conclusiones se vean sesgadas por las alteraciones observadas en la comunidad microbiana asociada.

Las macroalgas verdes han demostrado que pueden mejorar varios parámetros de la respuesta inmunitaria innata, como actividad lisozima, vías del complemento o actividad fagocítica en distintas especies de peces (Akbari y Aminikhoei, 2018; Safavi y col., 2019; Zhou y col., 2020). La incorporación de *U. intestinalis* en baja proporción en la dieta, aumentó la expresión de genes antioxidantes y relacionados con el crecimiento en el pez cebra (Rouhani y col., 2022). En otras especies de peces, el aumento de la inflamación del intestino se ha relacionado con enteritis, tras la inclusión en la dieta de proteínas vegetales que no son digeridas adecuadamente por peces carnívoros (Sahlmann y col., 2013; Tacchi y col., 2012). El ulvano (compuesto extraído de *U. ohnoi*) no es citotóxico y activa perfiles de expresión de vías de señalización del sistema inmunitario del lenguado senegalés (Ponce y col., 2020, 2024). No obstante, debe estudiarse su efecto sobre la transcripción génica a nivel intestinal. Investigaciones previas llevadas a cabo por Vizcaino y col., (2019) utilizando un 5% de *U. onhoi* en la alimentación de lenguado senegalés, indicaron cambios en la expresión de numerosos genes metabólicos y un aumento significativo en la expresión de genes asociados con la funcionalidad epitelial (fosfatasa alcalina y proteína aminopeptidasa N), lo cual sugiere una posible mejora en la capacidad de absorción intestinal.

Por otro lado, existen estudios que han demostrado el efecto *in vitro* inmunoestimulante de cepas bacterianas no viables, como las investigadas por Salinas y col., (2006), quienes observaron este efecto en las cepas bacterianas 51M6 (de la familia *Vibrionaceae*), *L. delbrückii* subsp. *lactis*, *B. subtilis* y SpPdp11 inactivadas por calor en dorada. De igual manera, Domínguez-Maqueda y col., (2021) obtuvieron niveles similares de transcripción génica en la expresión de

genes implicados en la inmunidad intestinal en un ensayo *in vivo* con células viables e inactivadas por calor de SpPdp11 en experimentos con lenguado senegalés, demostrando que la viabilidad bacteriana no era esencial para su efecto inmunomodulador.

En esta Tesis, el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 o productos derivados del mismo, parece influir en la expresión de genes relacionados con la matriz extracelular y los receptores de esta matriz. Los metabolitos procedentes del probiótico parecen generar una respuesta que influye en la regulación del citoesqueleto y la migración celular, la señalización del ciclo y división celular, como se describen en los resultados de los Capítulos 3 y 5, independientemente del hospedador o el tejido estudiado. Estos hallazgos concuerdan con resultados obtenidos en intestino tras la utilización de probióticos vivos en la ostra (*Crassostrea virginica*) (Modak y Gomez-Chiarri, 2020) o en aves de corral (Memon y col., 2021). En investigaciones realizadas en humanos, Pinto y col., (2011) demostraron que el sobrenadante libre de células de *L. plantarum* promovía la re-epitelización en cultivos de queratinocitos, planteándose que existía una sustancia específica, la plantaricina A, que estimulaba la migración y proliferación celular. De igual manera, derivados del probiótico *L. rhamnosus* GG regulaban la supervivencia y el crecimiento de células epiteliales dañadas (Yan y Polk, 2012).

Recientemente, Domínguez-Maqueda y col., (2024) han evaluado el potencial postbiótico de los productos extracelulares de SpPdp11, obteniendo resultados que muestran una reducción en la formación de biopelículas de patógenos bacterianos en peces, el aumento de la viabilidad celular en líneas celulares de peces, la presencia de actividades enzimáticas y metabolitos de interés, así como se ha demostrado la disminución en el título del virus de la necrosis nerviosa (NNV) (Moreno y coll., 2023), según se cambiaba el medio de cultivo al que fueron sometidas las células. El uso de postbióticos sería un avance más en cuanto a la obtención de productos de aplicación en la industria acuícola, y con un gran potencial para la obtención de moléculas de interés al modificar las condiciones de cultivo bacteriano (Chang y col., 2021; Quintanilla-Pineda y col., 2023a; Quintanilla-Pineda y col, 2023b). Esto ayudaría a mejorar las propiedades que se desean en las dietas con vistas a satisfacer los requerimientos de los distintos organismos acuáticos, que pueden ser diferentes dependiendo del estadio de desarrollo, del ambiente y del estado de salud del organismo.

Una mayor investigación en el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 podría revelar los mecanismos moleculares responsables de los efectos beneficiosos observados y ampliar el conocimiento en el desarrollo de su formulación para dietas en acuicultura.

En consecuencia, los resultados han mostrado que, aunque se produjeron alteraciones en la microbiota intestinal de *S. senegalensis*, estas no comprometieron la integridad intestinal de los peces. En particular, la dieta paraprobiótica mejoró la morfología intestinal, evidenciando propiedades antiinflamatorias y una mayor eficacia en la absorción de nutrientes en comparación con la dieta control.

Referencias

- Adeoye, A. A., Yomla, R., Jaramillo-Torres, A., Rodiles, A., Merrifield, D. L., & Davies, S. J. (2016). Combined effects of exogenous enzymes and probiotic on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, intestinal morphology and microbiome. *Aquaculture*, 463, 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.028>
- Agboola, J. O., Teuling, E., Wierenga, P. A., Gruppen, H., & Schrama, J. W. (2019). Cell wall disruption: An effective strategy to improve the nutritive quality of microalgae in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture Nutrition*, 25(4), 783-797. <https://doi.org/10.1111/anu.12896>
- Akbary, P., & Aminikhoei, Z. (2018). Effect of water-soluble polysaccharide extract from the green alga *Ulva rigida* on growth performance, antioxidant enzyme activity, and immune stimulation of grey mullet *Mugil cephalus*. *Journal of Applied Phycology*, 30(2), 1345-1353. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1299-8>
- Akter, S., Park, J. H., & Jung, H. K. (2020). Potential Health-promoting benefits of paraprobiotics, inactivated probiotic cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 477-481. <https://doi.org/10.4014/JMB.1911.11019>
- Almeida, D. B., Semedo, M., Magalhães, C., Blanquet, I., & Mucha, A. P. (2023). Sole microbiome progression in a hatchery life cycle, from egg to juvenile. *Frontiers in Microbiology*, 14(June), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1188876>
- Annamalai, S. N., Das, P., Thaher, M. I. A., Abdul Quadir, M., Khan, S., Mahata, C., & Al Jabri, H. (2021). Nutrients and energy digestibility of microalgal biomass for fish feed applications. *Sustainability (Switzerland)*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/su132313211>
- Apper, E., Weissman, D., Respondek, F., Guyonvarch, A., Baron, F., Boisot, P., Rodiles, A., & Merrifield, D. L. (2016). Hydrolysed wheat gluten as part of a diet based on animal and plant proteins supports good growth performance of Asian seabass (*Lates calcarifer*), without impairing intestinal morphology or microbiota. *Aquaculture*, 453, 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.018>
- Ayala, M. D., Balsalobre, N., Chaves-Pozo, E., Sáez, M. I., Galafat, A., Alarcón, F. J., & Arizcun, M. (2023). Long-term effects of a short juvenile feeding period with diets enriched with the microalgae *Nannochloropsis gaditana* on the subsequent body and muscle growth of gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Animals*, 13(3), 482. <https://doi.org/10.3390/ani13030482>
- Bahi, A., Ramos-Vega, A., Angulo, C., Monreal-Escalante, E., & Guardiola, F. A. (2023). Microalgae with immunomodulatory effects on fish. *Reviews in Aquaculture*, 15(4), 1522-1539. <https://doi.org/10.1111/raq.12792>
- Berggren, H., Tibblin, P., Yildirim, Y., Broman, E., Larsson, P., Lundin, D., & Forsman, A. (2022). Fish skin microbiomes are highly variable among individuals and populations but not within individuals. *Frontiers in Microbiology*, 12, 767770. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.767770>
- Bharathi, S., Antony, C., Rajagopalasamy, C. B. T., Uma, A., Ahilan, B., & Aanand, S. (2019). Functional feed additives used in fish feeds. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 7(3), 44-52.
- Bledsoe, J. W., Pietrak, M. R., Burr, G. S., Peterson, B. C., & Small, B. C. (2022). Functional feeds marginally alter immune expression and microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar*) gut, gill, and skin mucosa though evidence of tissue-specific signatures and host-microbe coadaptation remain. *Animal Microbiome*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00173-0>

- Bozzi, D., Rasmussen, J. A., Carøe, C., Sveier, H., Nordøy, K., Gilbert, M. T. P., & Limborg, M. T. (2021). Salmon gut microbiota correlates with disease infection status: potential for monitoring health in farmed animals. *Animal Microbiome*, 3(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00096-2>
- Cabral, E. M., Fernandes, T. J. R., Campos, S. D., Castro-Cunha, M., Oliveira, M. B. P. P., Cunha, L. M., & Valente, L. M. P. (2013). Replacement of fish meal by plant protein sources up to 75% induces good growth performance without affecting flesh quality in ongrowing Senegalese sole. *Aquaculture*, 380–383, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.12.006>
- Cámara-Ruiz, M., Cerezo, I. M., Guardiola, F. A., García-Beltrán, J. M., Balebona, M. C., Moriñigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2021). Alteration of the Immune Response and the Microbiota of the Skin during a Natural Infection by *Vibrio harveyi* in European Seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Microorganisms*, 9(5), 964. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9050964>
- Cerezuela, R., Guardiola, F. A., Cuesta, A., & Esteban, M. Á. (2016). Enrichment of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) diet with palm fruit extracts and probiotics: Effects on skin mucosal immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 49, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.028>
- Chang, H. M., Foo, H. L., Loh, T. C., Lim, E. T. C., & Abdul Mutalib, N. E. (2021). Comparative studies of inhibitory and antioxidant activities, and organic acids compositions of postbiotics produced by probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from malaysian foods. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 602280. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2020.602280/BIBTEX>
- Chen, Z., Ceballos-Francisco, D., Guardiola, F. A., Huang, D., & Esteban, M. Á. (2020). Skin wound healing in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed diets supplemented with arginine. *Fish and Shellfish Immunology*, 104, 347–358. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.06.026>
- Chiarello, M., McCauley, M., Villéger, S., & Jackson, C. R. (2022). Ranking the biases: The choice of OTUs vs. ASVs in 16S rRNA amplicon data analysis has stronger effects on diversity measures than rarefaction and OTU identity threshold. *PLoS ONE*, 17(2 February), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264443>
- Chiarello, M., Paz-Vinas, I., Veyssière, C., Santoul, F., Loot, G., Ferriol, J., & Boulêtreau, S. (2019). Environmental conditions and neutral processes shape the skin microbiome of European catfish (*Silurus glanis*) populations of Southwestern France. *Environmental Microbiology Reports*, 11(4), 605–614. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12774>
- Chiarello, M., Villéger, S., Bouvier, C., Bettarel, Y., & Bouvier, T. (2015). High diversity of skin-associated bacterial communities of marine fishes is promoted by their high variability among body parts, individuals and species. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(7), fiv061. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv061>
- Côte, J., Jacquin, L., Veyssière, C., Manzi, S., Etienne, R., Perrault, A., Cambon, M. C., Jean, S., & White, J. (2022). Changes in fish skin microbiota along gradients of eutrophication in human-altered rivers. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(1). <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIAC006>
- Desai, A. R., Links, M. G., Collins, S. A., Mansfield, G. S., Drew, M. D., Van Kessel, A. G., & Hill, J. E. (2012). Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350–353, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.005>
- Domínguez-Maqueda, M., Cerezo, I. M., Tapia-Paniagua, S. T., De La Banda, I. G., Moreno-Ventas, X., Moriñigo, M. Á., & Balebona, M. C. (2021). A tentative study of the effects of heat-inactivation of the probiotic strain shewanella putrefaciens ppd11 on senegalese sole (*Solea senegalensis*) intestinal microbiota and immune response. *Microorganisms*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040808>

- Domínguez-Maqueda, M., García-Márquez, J., Tapia-Paniagua, S. T., González-Fernández, C., Cuesta, A., Espinosa-Ruíz, C., Esteban, M. Á., Alarcón, F. J., Balebona, M. C., & Moriñigo, M. Á. (2024). Evaluation of the Differential Postbiotic Potential of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 Cultured in Several Growing Conditions. *Marine Biotechnology*, 26(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s10126-023-10271-y>
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 343795. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00873/>
- Fijan, S., Frauwallner, A., Langerholc, T., Krebs, B., ter Haar (née Younes), J. A., Heschl, A., Mičetić Turk, D., & Rogelj, I. (2019). Efficacy of using probiotics with antagonistic activity against pathogens of wound infections: an integrative review of literature. *BioMed Research International*, 2019, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2019/7585486>
- Firmino, J. P., Fernández-Alacid, L., Vallejos-Vidal, E., Salomón, R., Sanahuja, I., Tort, L., Ibarz, A., Reyes-López, F. E., & Gisbert, E. (2021). Carvacrol, thymol, and garlic essential oil promote skin innate immunity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) Through the multifactorial modulation of the secretory pathway and enhancement of mucus protective capacity. *Frontiers in Immunology*, 12, 633621. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.633621>
- Firmino, J. P., Vallejos-Vidal, E., Sarasquete, C., Ortiz-Delgado, J. B., Balasch, J. C., Tort, L., Estevez, A., Reyes-López, F. E., & Gisbert, E. (2020). Unveiling the effect of dietary essential oils supplementation in *Sparus aurata* gills and its efficiency against the infestation by *Sparicotyle chrysophrii*. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–23. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74625-5>
- Galafat, A., Vizcaíno, A. J., Sáez, M. I., Martínez, T. F., Jérez-Cepa, I., Mancera, J. M., & Alarcón, F. J. (2020). Evaluation of *Arthrospira* sp. enzyme hydrolysate as dietary additive in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Journal of Applied Phycology*, 32(5), 3089–3100. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02141-0>
- Ghanbari, M., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2015). A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. In *Aquaculture* (Vol. 448, pp. 464–475). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>
- Greuter, T., Navarini, A., & Vavricka, S. R. (2017). Skin manifestations of inflammatory bowel disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 53(3), 413–427. <https://doi.org/10.1007/s12016-017-8617-4>
- Jorge, S. S., Enes, P., Serra, C. R., Castro, C., Iglesias, P., Oliva Teles, A., & Couto, A. (2019). Short-term supplementation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) diets with *Nannochloropsis gaditana* modulates intestinal microbiota without affecting intestinal morphology and function. *Aquaculture Nutrition*, 25(6), 1388–1398. <https://doi.org/10.1111/anu.12959>
- Kim, M., Choi, K. H., Hwang, S. W., Lee, Y. B., Park, H. J., & Bae, J. M. (2017). Inflammatory bowel disease is associated with an increased risk of inflammatory skin diseases: A population-based cross-sectional study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 76(1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.08.022>
- Kokou, F., Sasson, G., Mizrahi, I., & Cnaani, A. (2020). Antibiotic effect and microbiome persistence vary along the European seabass gut. *Scientific Reports*, 10(1), 10003. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66622-5>
- Legrand, T. P. R. A., Catalano, S. R., Wos-Oxley, M. L., Stephens, F., Landos, M., Bansemer, M. S., Stone, D. A. J., Qin, J. G., & Oxley, A. P. A. (2018). The inner workings of the outer surface: skin and gill microbiota as indicators of changing gut health in yellowtail kingfish. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2664. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02664>

- Lewis, V. G., Ween, M. P., & McDevitt, C. A. (2012). The role of ATP-binding cassette transporters in bacterial pathogenicity. *Protoplasma*, 249(4), 919–942. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0360-8>
- Mansour, A. T., Espinosa, C., García-Beltrán, J. M., Miao, L., Ceballos Francisco, D. C., Alsaqufi, A. S., & Esteban, M. Á. (2020). Dietary supplementation of drumstick tree, *Moringa oleifera*, improves mucosal immune response in skin and gills of seabream, *Sparus aurata*, and attenuates the effect of hydrogen peroxide exposure. *Fish Physiology and Biochemistry*, 46(3), 981–996. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00763-2>
- Memon, F. U., Yang, Y., Leghari, I. H., Lv, F., Soliman, A. M., Zhang, W., & Si, H. (2021). Transcriptome analysis revealed ameliorative effects of bacillus based probiotic on immunity, gut barrier system, and metabolism of chicken under an experimentally induced *Eimeria tenella* infection. *Genes*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/genes12040536>
- Messina, C. M., Madia, M., Manuguerra, S., Espinosa-Ruiz, C., Esteban, M. A., & Santulli, A. (2023). Dietary inclusion of *Halobacterium salinarum* modulates growth performances and immune responses in farmed gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Animals*, 13(17). <https://doi.org/10.3390/ani13172743>
- Modak, T. H., & Gomez-Chiarri, M. (2020). Contrasting immunomodulatory effects of probiotic and pathogenic bacteria on eastern oyster, *Crassostrea Virginica*, Larvae. *Vaccines*, 8(4), 588. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040588>
- Mohammedsaeed, W., Cruickshank, S., McBain, A. J., & O'Neill, C. A. (2015). *Lactobacillus rhamnosus* GG lysate increases re-epithelialization of keratinocyte scratch assays by promoting migration. *Scientific Reports*, 5(1), 16147. <https://doi.org/10.1038/srep16147>
- Molina-Roque, L., Bárány, A., Sáez, M. I., Alarcón, F. J., Tapia, S. T., Fuentes, J., Mancera, J. M., Perera, E., & Martos-Sitcha, J. A. (2022). Biotechnological treatment of microalgae enhances growth performance, hepatic carbohydrate metabolism and intestinal physiology in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles close to commercial size. *Aquaculture Reports*, 25, 101248. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101248>
- Moreira, A., Cruz, S., Marques, R., & Cartaxana, P. (2022). The underexplored potential of green macroalgae in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 14(1), 5–26. <https://doi.org/10.1111/raq.12580>
- Moreno, P., Álvarez-Torres, D., Balebona, M. C., Domínguez-Maqueda, M., Moriñigo, M. Á., Béjar, J., Alonso, M. C., & García-Rosado, E. (2023). Inhibition of nervous necrosis virus replication by *Shewanella putrefaciens* Pdp11 extract. *Aquaculture*, 575. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739812>
- Niccolai, A., Chini Zittelli, G., Rodolfi, L., Biondi, N., & Tredici, M. R. (2019). Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility. *Algal Research*, 42, 101617. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101617>
- Nonis, A., De Nardi, B., & Nonis, A. (2014). Choosing between RT-qPCR and RNA-seq: A back-of-the-envelope estimate towards the definition of the break-even-point. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(15), 3533–3536. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7687-x>

- Piazzon, M. C., Calduch-Giner, J. A., Fouz, B., Estensoro, I., Simó-Mirabet, P., Puyalto, M., Karalazos, V., Palenzuela, O., Sitjà-Bobadilla, A., & Pérez-Sánchez, J. (2017). Under control: how a dietary additive can restore the gut microbiome and proteomic profile, and improve disease resilience in a marine teleostean fish fed vegetable diets. *Microbiome*, 5(1), 164. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0390-3>
- Pinto, D., Marzani, B., Minervini, F., Calasso, M., Giuliani, G., Gobbetti, M., & De Angelis, M. (2011). Plantaricin A synthesized by *Lactobacillus plantarum* induces *in vitro* proliferation and migration of human keratinocytes and increases the expression of TGF- β 1, FGF7, VEGF-A and IL-8 genes. *Peptides*, 32(9), 1815–1824. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.07.004>
- Ponce, M., Anguís, V., & Fernández-Díaz, C. (2024). Assessing the role of ulvan as immunonutrient in *Solea senegalensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 146, 109399. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109399>
- Ponce, M., Zuasti, E., Anguís, V., & Fernández-Díaz, C. (2020). Effects of the sulfated polysaccharide ulvan from *Ulva ohnoi* on the modulation of the immune response in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 100, 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.02.054>
- Prodan, A., Tremaroli, V., Brolin, H., Zwinderman, A. H., Nieuwdorp, M., & Levin, E. (2020). Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PLoS ONE*, 15(1), e0227434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227434>
- Quero, G. M., Piredda, R., Basili, M., Maricchiolo, G., Mirto, S., Manini, E., Seyfarth, A. M., Candela, M., & Luna, G. M. (2023). Host-associated and environmental microbiomes in an open-sea mediterranean gilthead sea bream fish farm. *Microbial Ecology*, 86(2), 1319–1330. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02120-7>
- Quintanilla-Pineda, M., Achou, C. G., Díaz, J., Gutiérrez-Falcon, A., Bravo, M., Herrera-Muñoz, J. I., Peña-Navarro, N., Alvarado, C., Ibañez, F. C., & Marzo, F. (2023a). *In Vitro* Evaluation of postbiotics produced from bacterial isolates obtained from rainbow trout and nile tilapia against the pathogens *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Foods*, 12(4), 861. <https://doi.org/10.3390/FOODS12040861>
- Quintanilla-Pineda, M., Díaz, J., Gutiérrez-Falcon, A., Ibañez, F. C., & Marzo, F. (2023b). Profiling a new postbiotic product for its application in fish aquaculture. *Fishes*, 8(6), 304. <https://doi.org/10.3390/fishes8060304>
- Rasmussen, J. A., Villumsen, K. R., von Gersdorff Jørgensen, L., Forberg, T., Zuo, S., Kania, P. W., Buchmann, K., Kristiansen, K., Bojesen, A. M., & Limborg, M. T. (2022). Integrative analyses of probiotics, pathogenic infections and host immune response highlight the importance of gut microbiota in understanding disease recovery in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Microbiology*, 132(4), 3201–3216. <https://doi.org/10.1111/jam.15433>
- Ray, A. K., Ghosh, K., & Ringø, E. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*, 18(5), 465–492. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2095.2012.00943.X>
- Riera, J. L., & Baldo, L. (2020). Comparative co-occurrence network analyses of the cichlid fish gut microbiota: community conservation and diet-associated shifts. *Health Evaluation and Promotion*, 47(1), 248–250. <https://doi.org/10.1101/2020.05.26.118232>

- Ringø, E., Zhou, Z., Vecino, J. L. G., Wadsworth, S., Romero, J., Krogdahl, Å., Olsen, R. E., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Owen, M., Lauzon, H. L., Martinsen, L. L., De Schryver, P., Bossier, P., Sperstad, S., & Merrifield, D. L. (2016). Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquaculture Nutrition*, 22(2), 219–282. <https://doi.org/10.1111/anu.12346>
- Rosado, D., Pérez-Losada, M., Pereira, A., Severino, R., & Xavier, R. (2021). Effects of aging on the skin and gill microbiota of farmed seabass and seabream. *Animal Microbiome*, 3(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s42523-020-00072-2>
- Rouhani, E., Safari, R., Imanpour, M. R., Hoseinifar, S. H., Yazici, M., & El-Haroun, E. (2022). Effect of dietary administration of green macroalgae (*Ulva intestinalis*) on mucosal and systemic immune parameters, antioxidant defence, and related gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture Nutrition*, 2022, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2022/7693468>
- Ruff, W. E., Greiling, T. M., & Kriegel, M. A. (2020). Host–microbiota interactions in immune-mediated diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 18(9), 521–538. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0367-2>
- Sáez, M. I., Galafat, A., Vizcaino, A. J., Chaves-Pozo, E., Ayala, M. D., Arizcun, M., Alarcón, F. J., Suárez, M. D., & Martínez, T. F. (2022). Evaluation of *Nannochloropsis gaditana* raw and hydrolysed biomass at low inclusion level as dietary functional additive for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 556, 738288. <https://doi.org/10.1016/j.AQUACULTURE.2022.738288>
- Sáez, M.I., Galafat, A., Suárez, M.D., Chaves-Pozo, E., Arizcun, M., Ayala, M. D., Alarcón, F.J. & Martínez, T. F. Effects of raw and hydrolysed *Nannochloropsis gaditana* biomass included at low level in finishing diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) on fillet quality and shelf life. *Journal Applied Phycology* 35, 1163–1181 (2023). <https://doi.org/10.1007/s10811-023-02957-6>
- Safavi, S. V., Kenari, A. A., Tabarsa, M., & Esmaeili, M. (2019). Effect of sulfated polysaccharides extracted from marine macroalgae (*Ulva intestinalis* and *Gracilariopsis persica*) on growth performance, fatty acid profile, and immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Phycology*, 31(6), 4021–4035. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01902-w>
- Sahlmann, C., Sutherland, B. J. G., Kortner, T. M., Koop, B. F., Krogdahl, Å., & Bakke, A. M. (2013). Early response of gene expression in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during the development of soybean meal induced enteritis. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(2), 599–609. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.031>
- Salem, I., Ramser, A., Isham, N., & Ghannoum, M. A. (2018). The gut microbiome as a major regulator of the gut-skin axis. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 382698. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01459/>
- Salinas, I., Díaz-Rosales, P., Cuesta, A., Meseguer, J., Chabrilón, M., Moriñigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2006). Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 111(3–4), 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.VETIMM.2006.01.020>
- Sanahuja, I., Fernandez-Alacid, L., Torrecillas, S., Ruiz, A., Vallejos-Vidal, E., Firmino, J. P., Reyes-Lopez, F. E., Tort, L., Tovar-Ramirez, D., Ibarz, A., & Gisbert, E. (2023). Dietary *Debaryomyces hansenii* promotes skin and skin mucus defensive capacities in a marine fish model. *Frontiers in Immunology*, 14, 1247199. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1247199/>

- Sanahuja, I., Ruiz, A., Firmino, J. P., Reyes-López, F. E., Ortiz-Delgado, J. B., Vallejos-Vidal, E., Tort, L., Tovar-Ramírez, D., Cerezo, I. M., Moriñigo, M. A., Sarasquete, C., & Gisbert, E. (2023). *Debaryomyces hansenii* supplementation in low fish meal diets promotes growth, modulates microbiota and enhances intestinal condition in juvenile marine fish. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s40104-023-00895-4>
- Schmidt, V. T., Smith, K. F., Melvin, D. W., & Amaral-Zettler, L. A. (2015). Community assembly of a euryhaline fish microbiome during salinity acclimation. *Molecular Ecology*, 24(10), 2537–2550. <https://doi.org/10.1111/mec.13177>
- Siddik, M. A. B., Sørensen, M., Islam, S. M. M., Saha, N., Rahman, M. A., & Francis, D. S. (2024). Expanded utilisation of microalgae in global aquafeeds. *Reviews in Aquaculture* 16(1) 6–33. <https://doi.org/10.1111/raq.12818>
- Silva, J. M. G., Espe, M., Conceição, L. E. C., Dias, J., Costas, B., & Valente, L. M. P. (2010). Feed intake and growth performance of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) fed diets with partial replacement of fish meal with plant proteins. *Aquaculture Research*, 41(9), e20–e30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02451.x>
- Sinha, S., Lin, G., & Ferenczi, K. (2021). The skin microbiome and the gut-skin axis. *Clinics in Dermatology*, 39(5), 829–839. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2021.08.021>
- Sultan, M., Arya, R., & Kim, K. K. (2021). Roles of two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22) 12152. <https://doi.org/10.3390/ijms222212152>
- Sylvain, F. É., Holland, A., Bouslama, S., Audet-Gilbert, É., Lavoie, C., Luis Val, A., & Derome, N. (2020). Fish skin and gut microbiomes show contrasting signatures of host species and habitat. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(16), 1–15. <https://doi.org/10.1128/AEM.00789-20>
- Tacchi, L., Secombes, C. J., Bickerdike, R., Adler, M. A., Venegas, C., Takle, H., & Martin, S. A. M. (2012). Transcriptomic and physiological responses to fishmeal substitution with plant proteins in formulated feed in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*, 13(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-363>
- Tapia-Paniagua, S. T., Balebona, M. D. C., Firmino, J. P., Rodríguez, C., Polo, J., Moriñigo, M. A., & Gisbert, E. (2020). The effect of spray-dried porcine plasma on gilthead seabream (*Sparus aurata*) intestinal microbiota. *Aquaculture nutrition*, 26(3), 801–811.
- Tarnecki, A. M., Brennan, N. P., Schloesser, R. W., & Rhody, N. R. (2019). Shifts in the skin-associated microbiota of hatchery-reared common snook *Centropomus undecimalis* During Acclimation to the Wild. *Microbial Ecology*, 77(3), 770–781. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1252-7>
- Tremaroli, V., & Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489(7415), 242–249. <https://doi.org/10.1038/nature11552>
- Valente, L. M. P., Linares, F., Villanueva, J. L. R., Silva, J. M. G., Espe, M., Escórcio, C., Pires, M. A., Saavedra, M. J., Borges, P., Medale, F., Álvarez-Blázquez, B., & Peleteiro, J. B. (2011). Dietary protein source or energy levels have no major impact on growth performance, nutrient utilisation or flesh fatty acids composition of market-sized Senegalese sole. *Aquaculture*, 318(1–2), 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.026>

- Vizcaíno, A. J., Fumanal, M., Sáez, M. I., Martínez, T. F., Moriñigo, M. A., Fernández-Díaz, C., Anguis, V., Balebona, M. C., & Alarcón, F. J. (2019). Evaluation of *Ulva ohnoi* as functional dietary ingredient in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Effects on the structure and functionality of the intestinal mucosa. *Algal Research*, 42, 101608. <https://doi.org/10.1016/j.ALGAL.2019.101608>
- Vizcaíno, Antonio Jesús, Mendes, S. I., Varela, J. L., Ruiz-Jarabo, I., Rico, R., Figueroa, F. L., Abdala, R., Moriñigo, M. Á., Mancera, J. M., & Alarcón, F. J. (2016). Growth, tissue metabolites and digestive functionality in *Sparus aurata* juveniles fed different levels of macroalgae, *Gracilaria cornea* and *Ulva rigida*. *Aquaculture Research*, 47(10), 3224–3238. <https://doi.org/10.1111/are.12774>
- Wilkins, N. P., & Jancsar, S. (1979). Temporal variations in the skin of Atlantic salmon *Salmo solar* L. *Journal of Fish Biology*, 15(3), 299–307. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1979.tb03609.x>
- Wu, C.-Y., Chang, Y.-T., Juan, C.-K., Shieh, J.-J., Lin, Y.-P., Liu, H.-N., Lin, J.-T., & Chen, Y.-J. (2017). Risk of inflammatory bowel disease in patients with rosacea: Results from a nationwide cohort study in Taiwan. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 76(5), 911–917. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.11.065>
- Wu, X., Teame, T., Hao, Q., Ding, Q., Liu, H., Ran, C., Yang, Y., Zhang, Y., Zhou, Z., Duan, M., & Zhang, Z. (2020). Use of a paraprobiotic and postbiotic feed supplement (HWF™) improves the growth performance, composition and function of gut microbiota in hybrid sturgeon (*Acipenser baerii* x *Acipenser schrenckii*). *Fish and Shellfish Immunology*, 104, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.054>
- Wu, Y., Xiao, F., Wang, C., Shu, L., Zheng, X., Xu, K., Yu, X., Zhang, K., Luo, H., Yang, Y., He, Z., & Yan, Q. (2020). The beta-diversity of *Siganus fuscescens*-associated microbial communities from different habitats increases with body weight. *Frontiers in Microbiology*, 11(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01562>
- Yan, F., & Polk, D. B. (2012). Characterization of a probiotic-derived soluble protein which reveals a mechanism of preventive and treatment effects of probiotics on intestinal inflammatory diseases. *Gut Microbes*, 3(1), 25–28. <https://doi.org/10.4161/gmic.19245>
- You, C., Chen, B., Wang, M., Wang, S., Zhang, M., Sun, Z., Juventus, A. J., Ma, H., & Li, Y. (2019). Effects of dietary lipid sources on the intestinal microbiome and health of golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 89, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.FSI.2019.03.060>
- Yúfera, M., & Darías, M. J. (2007). Changes in the gastrointestinal pH from larvae to adult in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 267(1–4), 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.009>
- Zhou, Z., Pan, S., & Wu, S. (2020). Modulation of the growth performance, body composition and nonspecific immunity of crucian carp *Carassius auratus* upon *Enteromorpha prolifera* polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.065>



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Conclusiones





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

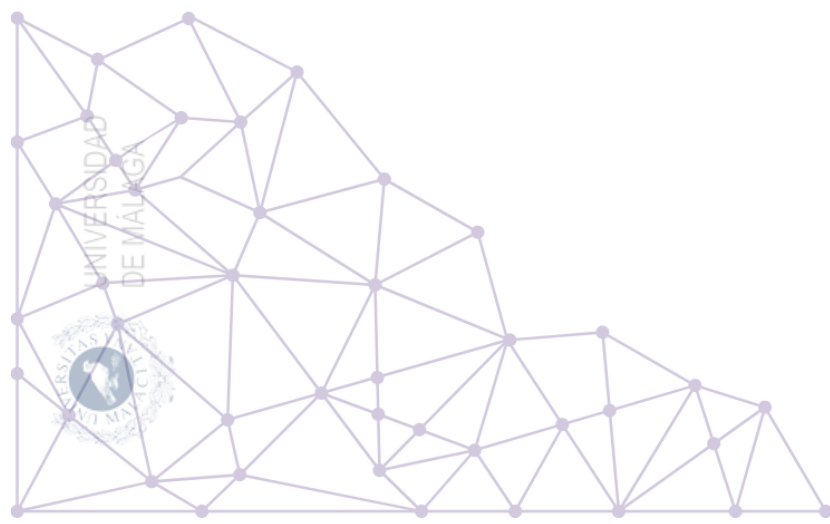
Conclusiones

1. La inclusión de un 5% de la microalga *Nannochloropsis gaditana* hidrolizada en la dieta de *Sparus aurata* no altera la composición taxonómica bacteriana presente en la microbiota intestinal ni la expresión de genes relacionados con la integridad y permeabilidad intestinal del pez.
2. La dieta con *Nannochloropsis* sp. y *Arthrospira* sp. mostró cambios sutiles en la composición taxonómica bacteriana de la microbiota de la piel y branquias de *S. aurata*, que afectaron a interacción de las redes bacterianas. Las branquias presentan mayor resiliencia y diversidad de nichos en comparación con la piel, siendo *Acinetobacter* y *Polaribacter* taxones clave.
3. En ejemplares de *S. aurata* con heridas en la piel, la dieta funcional con células vivas del probiótico SpPdp11 modula la microbiota de la piel y la expresión de genes relacionados con una mejor cicatrización, existiendo una correlación positiva entre ambos factores.
4. La alimentación de ejemplares de *Solea senegalensis* con una dieta suplementada con *Ulva ohnoi* se asocia con una modulación de la microbiota intestinal, especialmente en la sección posterior, detectándose un incremento en la abundancia de *Vibrio* y probable presencia de genes relacionados con la biodegradación y metabolismo de xenobióticos.
5. Las dietas suplementadas con el paraprobiótico preparado a partir de células de SpPdp11, modulan la microbiota y aportan beneficios a la salud intestinal y respuesta inflamatoria de *S. senegalensis*, reduciendo significativamente la abundancia del filo *Proteobacteria* y regulando la transcripción de genes con efectos antiinflamatorios.
6. La aplicación de las dietas funcionales ensayadas *S. aurata* y *S. senegalensis* mejora el estado de las mucosas y sin alterar el equilibrio de la microbiota intestinal, ofreciendo nuevas estrategias para mejorar la sostenibilidad y eficiencia en la acuicultura de estas dos especies piscícolas.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Anexos





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

