

Cambios en la microbiota intestinal de *Sparus aurata* tras la administración de dietas suplementadas con *D. hansenii* e INMUNOTEC

Cerezo I.M., Bautista R., Di Zeo D.E., Tapia-Paniagua S.T., Balebona M.C., Gisbert E., Moriñigo M.A.

Abstract

Effects on the intestinal microbiota of *Sparus aurata* after administration of diets supplemented with different doses of *Debaryomyces hansenii* or INMUNOTEC have been evaluated. The results revealed significant changes at metagenomical level and it could be related to metabolic changes, especially in the case of the diet supplemented with the highest dose of IMMUNOTEC.

Resumen

En este estudio se analizan los efectos que la inclusión en la dieta de distintas dosis de *Debaryomyces hansenii* e INMUNOTEC tienen sobre la microbiota intestinal de ejemplares de *Sparus aurata*. Los resultados obtenidos revelaron cambios a nivel metagenómico, que podrían estar asociados con cambios metabólicos, especialmente en el caso de la dieta suplementada con la dosis más elevada de INMUNOTEC.

Justificación

En la actualidad, el sector acuícola busca conseguir una producción sostenible, que reduzca los riesgos para el consumidor y el medio ambiente. Numerosos estudios demuestran que la microbiota intestinal está estrechamente relacionada con la salud de los peces y uno de los principales factores que pueden afectar su composición es la dieta. Ello implica que sea imprescindible comprender lo mejor posible las consecuencias que se puedan derivar en la microbiota intestinal tras cambios en la dieta de los peces, y que efecto pueden ejercer sobre las interacciones entre la microbiota y su hospedador. Indudablemente, esto favorecerá el desarrollo de dietas beneficiosas (Tremaroli, V. et al., 2012).

Este ha sido el objetivo de este estudio realizado con grupos de ejemplares de *Sparus aurata*, una especie con importante peso económico en la acuicultura mediterránea. Un grupo de peces fue alimentado con una dieta comercial suplementada con diferentes dosis de la levadura *Debaryomyces hansenii*, mientras otros recibieron la dieta con dos dosis de compuestos que han sido reportados como eficientes inmunoestimulantes en peces (*Echinacea purpurea*, oligosacáridos mananos (MOS), β glucanos y vitamina C), denominado INMUNOTEC.

Material y métodos

Se establecieron 5 grupos de peces que recibieron 5 tratamientos diferentes: dieta control, la misma dieta suplementada con 1,1% ó 2,2% de *D. hansenii* y, dietas suplementadas con 0,15% o 0,30% de INMUNOTEC. A partir de 4 ejemplares de cada uno de los tratamientos, se tomaron muestras de intestino anterior y posterior.

A partir de las muestras, se extrajo ADN del contenido intestinal, mediante el protocolo de precipitación salina propuesto por Martínez y et al. (1998), seguido de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permitió amplificar las regiones variables del ARNr 16S V3V4. La secuenciación masiva fue realizada por el Servicio de Secuenciación Masiva del SCBI (Supercomputing and Bioinnovation Center de Málaga) empleando la tecnología Miseq Illumina. Las lecturas brutas recibidas se procesaron y permitieron la reconstrucción del amplicón mediante un flujo de trabajo que utiliza el programa bioinformático "Mothur". Las secuencias filtradas fueron asignadas taxonómicamente usando la base de datos Greengenes (Mayo 2013). Por último, toda la información obtenida se unificó en fichero tipo BIOM.

Para realizar una predicción de las capacidades funcionales de la microbiota intestinal de las muestras se utilizó el software informático PICRUST (Languille *et al.*, 2013). Por último, los análisis estadísticos se calcularon mediante el test estadístico DeSeq2 y *t-student* ($p < 0,05$) y se realizaron representaciones gráficas utilizando Excel, PAST v3.11 o R.

Resultados y discusión

Como resultado de la secuenciación se obtuvieron 455.559 lecturas totales, siendo 6498 las lecturas efectivas.

Se analizó la α -diversidad calculando los índices *Chao1*, *Shannon* y *Simpson*, los cuales no mostraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Los fila *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* son fila característicos de la microbiota intestinal de dorada (Kormas *et al.*, 2014). En ambas dietas, se observaron diferencias fundamentalmente a nivel de géneros cuya abundancia no superaba el 1% del total de secuencias (Tabla 1).

Tabla 1. Géneros cuya diferencia de abundancia es estadísticamente significativas.

Sección intestinal	Dieta	Géneros
Intestino anterior	<i>D. hansenii</i> (1,1%)	<i>Prevotella</i> , <i>Dialister</i> , <i>Marinomonas</i>
	<i>D. hansenii</i> (2,2%)	<i>Delftia</i>
Intestino posterior	<i>D. hansenii</i> (1,1%)	<i>Brevundimonas</i> , <i>Ruegeria</i> , <i>Fingoldia</i> , <i>Planctomices</i>
	<i>D. hansenii</i> (2,2%)	<i>Lactococcus</i> , <i>Rubrobacter</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Photobacterium</i>
Intestino anterior	INMUNOTEC (0,15%)	<i>Delftia</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Fluviicola</i> , <i>Thalassobius</i> , <i>Photobacterium</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Polaibacter</i> , <i>Lutimonas</i> , <i>Loktanella</i> , <i>Sediminibacterium</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Devosia</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Aerococcus</i>
	INMUNOTEC (0,3%)	<i>Delftia</i> , <i>Fluviicola</i> , <i>Ruegeria</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Dinoroseobacter</i> , <i>Aggregatibacter</i>
Intestino posterior	INMUNOTEC (0,15%)	<i>Pseudomonas</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Fingoldia</i>
	INMUNOTEC (0,3%)	<i>Leucothrix</i> , <i>Planctomyces</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Vurrucomicrobi</i> <i>um</i> , <i>Dialister</i> , <i>Nanotronomonas</i> , <i>Persicirhabdus</i> , <i>Fingoldia</i>

Se llevó a cabo una predicción sobre la funcionalidad de la microbiota intestinal, obteniendo resultados estadísticamente significativos respecto a la dieta control en los intestinos posteriores de peces a los que se administró la dieta INMUNOTEC 0,3%, cambios que predicen una mayor implicación de la microbiota intestinal de estos peces en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, lo que puede ser determinante para los peces bajo situaciones en las que necesiten un mayor aporte energético y una mayor síntesis de proteínas .

Bibliografía:

- Kormas, K.A., Meziti, A., Mente, E., & Frenzoz, A. (2014). Dietary differences are reflected on the gut prokaryotic community structure of wild and commercially reared sea bream (*Sparus aurata*). *Microbiology*, 3(5), 718-728.
- Langille, M.G., Zaneveld, J., Caporaso, J.G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J.A. & Beiko, R.G. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology*, 31(9), 814.
- Martínez G, Shaw EM, Carrillo M, Zanuy S (1998) Protein salting-out method applied to genomic DNA

isolation from fish whole blood. *Biotechniques* 24:138–139

Tremaroli, V. y Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489(7415), 242.

Agradecimientos

Proyecto DIETaplus, JACUMAR (Junta de Cultivos Marinos, MAPAMA). Cofinanciado fondos FEMP