

Efecto de la inclusión de *Chlorella fusca* en la dieta de lisas cultivadas (*Chelon labrosus*) sobre la expresión génica y a la microbiota de los peces

Jorge García-Márquez (Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Instituto Andaluz de Biotecnología y Desarrollo Azul (IBYDA). Campus Universitario de Teatinos s/n, 29071, Málaga, España), Daniel Álvarez-Torres (Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Instituto Andaluz de Biotecnología y Desarrollo Azul (IBYDA). Campus Universitario de Teatinos s/n, 29071, Málaga, España), Isabel María Cerezo (Unidad de Bioinformática-SCBI, Parque Tecnológico, Universidad de Málaga, 29590, Málaga, España), Marta Domínguez-Maqueda (Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Instituto Andaluz de Biotecnología y Desarrollo Azul (IBYDA). Campus Universitario de Teatinos s/n, 29071, Málaga, España), Félix López Figueroa (Departamento de Ecología y Geología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Instituto Andaluz de Biotecnología y Desarrollo Azul (IBYDA). Campus Universitario de Teatinos s/n, 29071, Málaga, España), Eduardo Martínez-Manzanares (Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Instituto Andaluz de Biotecnología y Desarrollo Azul (IBYDA). Campus Universitario de Teatinos s/n, 29071, Málaga, España), Roberto Teófilo Abdala-Díaz (Departamento de Ecología y Geología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Instituto Andaluz de Biotecnología y Desarrollo Azul (IBYDA). Campus Universitario de Teatinos s/n, 29071, Málaga, España), Julia Béjar (Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Instituto Andaluz de Biotecnología y Desarrollo Azul (IBYDA). Campus Universitario de Teatinos s/n, 29071, Málaga, España), Salvador Arijó (Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Instituto Andaluz de Biotecnología y Desarrollo Azul (IBYDA). Campus Universitario de Teatinos s/n, 29071, Málaga, España)

Abstract

This work aimed at evaluating the effects of the inclusion of microalga *Chlorella fusca* on intestinal microbiota and gene expression in juvenile *Chelon labrosus*. Fish were fed a control diet (CT) or a diet containing 15 % *C. fusca* (C-15) biomass during 90 days. At genus level, while *Brevinema*, *Cetobacterium* and *Pseudomonas* were the predominant in both intestinal sections of CT specimens, *Pseudomonas* and *Mycoplasma* were the most abundant genus in C-15 group. In addition, the inclusion of *C. fusca* did not adversely affect bacterial functions, studied by predictive form. Overall, the study of gene expression indicate that fish fed *C. fusca* show a preventive response to certain stressful situations and protection against potential pathogens of both bacterial and viral origin.

Resumen

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos de la inclusión de la microalga *Chlorella fusca* sobre la microbiota intestinal y la expresión génica en juveniles de *Chelon labrosus*. Los peces fueron alimentados con una dieta de control (CT) o una dieta que contenía 15 % de biomasa de *C. fusca* (C-15) durante 90 días. A nivel de género, mientras que *Brevinema*, *Cetobacterium* y *Pseudomonas* fueron los predominantes en ambas secciones intestinales del grupo CT, *Pseudomonas* y *Mycoplasma* fueron el género más abundante en el grupo C-15. Además, la inclusión de *C. fusca* no afecta negativamente a las funciones bacterianas, estudiadas por forma predictiva. En general, el estudio de la expresión de genes indica que los peces alimentados con *C. fusca* muestran una respuesta de prevención ante ciertas situaciones de estrés y de protección frente a potenciales patógenos tanto de origen bacteriano como vírico.

Introducción

La búsqueda de componentes alimentarios más asequibles y que puedan aportar beneficios a la alimentación de los peces es una prioridad para conseguir una acuicultura más sostenible. En un trabajo previo (García-Márquez et al., 2022) se demostró la idoneidad de *Chlorella fusca*, incluida en la formulación del pienso al 15 %, como ingrediente dietético para los juveniles de *Chelon labrosus*. Los piensos diseñados mejoraron el crecimiento, la utilización de nutrientes, las actividades enzimáticas digestivas y metabólicas, así como la mucosa intestinal, capacidad de absorción y morfología intestinal de los peces alimentados con la microalga. Sin embargo, no está claro cómo una inclusión del 15 % de *C. fusca* puede influir en la microbiota intestinal y la expresión de determinados genes relacionados con el

metabolismo, estrés y sistema inmune. Numerosos estudios demuestran que la comunidad microbiana intestinal desempeña un papel crítico en una amplia variedad de procesos importantes, como el desarrollo del sistema inmunológico y la protección contra patógenos (Yukgehnaish et al., 2020), y uno de los principales factores que pueden afectar su composición es la dieta.

Por tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar si *C. fusca* incluida en la alimentación de *C. labrosus* podría alterar la estructura de la comunidad microbiana intestinal y modular la expresión de ciertos genes relacionados con el estrés, el metabolismo y la respuesta inmune.

Material y métodos

Seis grupos de 30 peces ($84,7 \pm 0,3$ g) se distribuyeron aleatoriamente en tanques de 1000 L acoplados a un sistema de acuicultura de recirculación (RAS), equipado con filtros físicos y biológicos, y mantenidos bajo fotoperiodo natural (noviembre de 2019 – febrero de 2020), en el rango de $17,9\text{--}23,8$ °C, y salinidad $1,0\text{--}1,2$ g L⁻¹. Se establecieron dos grupos experimentales por triplicado: peces alimentados con dieta control (grupo CT) y alimentados con una dieta con un 15 % de inclusión de *C. fusca* (grupo C-15). A tiempo 0 y tras 90 días de alimentación, 3 peces por réplica (9 por grupo experimental) fueron seleccionados al azar, y sacrificados mediante sobredosis del anestésico 2-fenoxietanol (1 mL L⁻¹). De estos ejemplares se tomaron muestras de intestino anterior y posterior, hígado y riñón cefálico, que se mantuvieron a -80 °C hasta su uso en diferentes análisis.

Para el estudio de la microbiota, a partir de las muestras de intestino anterior y posterior obtenidas a los 90 días, se extrajo el ADN mediante el protocolo de precipitación salina propuesto por Martínez 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, seguido del filtrado de calidad y análisis de las variantes de secuencia de amplicón (*amplicon sequence variants*, ASV) utilizando la biblioteca R DADA2. La asignación taxonómica de los ASV se realizó utilizando la base de datos SILVA, agrupada al 99 % de identidad y recortada a la región amplificada. Para realizar una predicción de las capacidades funcionales de la microbiota intestinal de las muestras se utilizó el software informático PICRUST2 (Languille et al., 2013).

La cuantificación de la expresión relativa de los genes involucrados en el metabolismo (*IGF-1* y ferritina) se llevaron a cabo en las muestras de hígado; los de estrés (*HIF3 α* y *abcb1*) en hígado, riñón e intestinos; y finalmente, los relacionados con el sistema inmune (*Mx*, *MHC2* y *C3*) en riñón e intestinos. La expresión génica se determinó mediante PCR cuantitativa (qPCR), después de la extracción de ARN de muestras obtenidas a día 0 y día 90. Los valores relativos de la expresión de ARNm fueron determinados mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et al., 2001) con respecto al gen de referencia Actina.

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 o R.

Resultados y discusión

A nivel de filo, Proteobacteria, Fusobacteriota y Spirochaetota estuvieron predominantemente presentes en ambas secciones intestinales del grupo CT. En el grupo C-15, mientras que Proteobacteria fue el filo predominante en ambas secciones, Firmicutes fue mayor en la sección anterior, y Fusobacteriota y Spirochaetota fueron más altos en la sección posterior. A nivel de género, mientras que *Brevinema*, *Cetobacterium* y *Pseudomonas* fueron los predominantes en ambas secciones intestinales del grupo CT, *Pseudomonas* y *Mycoplasma* fueron los géneros más abundantes en el grupo C-15. En este sentido, especies del género *Mycoplasma* y *Pseudomonas* han sido consideradas como potenciales probióticos en acuicultura (Li et al., 2016; Giri et al., 2020). Además, la inclusión de *C. fusca* no afecta negativamente a las funciones bacterianas, estudiadas por forma predictiva.

El análisis de expresión de genes en hígado mostró una disminución en la expresión de ferritina en el grupo C-15 a los 90 días, mientras que la expresión del gen *IGF-1* no varió entre grupos experimentales. En cuanto a los genes involucrados en la respuesta al estrés, el gen *abcb1* apenas sufrió cambios entre los distintos grupos experimentales y tejidos analizados, a excepción de las muestras de riñón, donde se redujo significativamente su expresión en el grupo C-15 a los 90 días. Por otra parte, el gen *HIF3 α* se mostró sobreexpresado de manera muy significativa en todos los órganos analizados del grupo C-15 a los 90 días. Finalmente, los genes relacionados con el sistema inmune en riñón aumentaron significativamente en el grupo C-15 a los 90 días, mientras que los niveles de *MHC2* y *C3* estuvieron sobreexpresados en el intestino anterior. En general, estos resultados indican que los peces alimentados con *C. fusca* muestran una respuesta de prevención ante ciertas situaciones de estrés y de protección frente a potenciales patógenos tanto de origen bacteriano como vírico.

Bibliografía

Alimentación y Nutrición

- García-Márquez, J., Galafat, A., Vizcaino, A. J., Barany, A., Martos-Sitcha, J. A., Mancera, J. M., Ación, G., Figueroa, F. L., Alarcón, F. J., Arijó, S., y 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.
- Giri, S.S., Jun, J.W., Yun, S., Kim, H.J., Kim, S.G., Kim, S.W., Woo, K.J., Han, S.J., Oh, W.T., Kwon, J., Sukumaran, V. y Park, S.C. 2020. Effects of dietary heat-killed *Pseudomonas aeruginosa* strain VSG2 on immune functions, antioxidant efficacy, and disease resistance in *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*. 514:734489.
- Langille, M.G.I., Zaneveld, J., Caporaso, J.G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J.A., Clemente, J.C., Burkepille, 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*. 31:814–821.
- Li, X., Yan, Q., Ringø, E., Wu, X., He, Y. y Yang, D. 2016. The influence of weight and gender on intestinal bacterial community of wild largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*, 1874). *BMC Microbiology*. 16:1–8.
- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Martínez, G., Shaw, E.M., Carrillo, M. y Zanuy, S. 1998. Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *Biotechniques*. 24:238–239.
- Yukgehnai, K., Kumar, P., Sivachandran, P., Marimuthu, K., Arshad, A., Paray, B. A. y 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.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL-2017-83260R y H2020-SABANA (#727874), así como por ayudas al Personal Técnico de Apoyo (PTA2020-018984-I).