

UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Microbiota como bioindicador de salud en especies marinas de
interés acuícola**

MARÍA CÁMARA RUIZ

2022

*“Uno nunca se da cuenta de lo que se ha hecho,
solo ve lo que queda por hacer”*

Marie Curie

Agradecimientos

A mi directora de Tesis, **Marian**, por darme la oportunidad de emprender este camino llamado investigación, por animarme y ayudarme durante los momentos más difíciles y soportarme en mis momentos más delicados. A mi co-director, **Miguel Ángel**, aunque no hayamos tenido el placer de conocernos en persona debido a la situación en la que mi tesis se ha desarrollado, tus aportaciones a este trabajo han sido imprescindibles. A ambos, gracias por estar conmigo en este viaje.

A mi **Chema**, no sé qué hubiera hecho sin tí. Gracias por estar siempre ahí ayudándome, aunque te costara dejar de lado otras cosas. En el laboratorio, en los acuarios y en la vida. Me llevo un gran amigo de este departamento y eso es lo mejor que te puede pasar.

A **Isabel**, gracias por los innumerables Zooms y mensajes. Por volcarte conmigo y ayudarme tanto, incluso cuando no tenías tiempo para lo tuyo, te lo agradeceré eternamente.

A **Diana**, por ser compañera y amiga. Gracias por estar ahí siempre para cualquier duda y siempre con una sonrisa por delante, eres magia.

A **Franguar**, por acogerme desde el minuto 1 que llegue a este departamento (allá por 2016) y guiarme en este camino.

A **Luciano**, por innumerables llamadas de ánimo y discusiones a la vez. Gracias por todo.

A mis compañeros **Cristóbal** (amo y señor del laboratorio), **JC** (el carragenista), **Javi**, **Nora**, **Carmen**, **Garcí**, **Laura** y **John**. Gracias por hacer la vida un poquito más fácil. Por el apoyo y la comprensión.

A **David**, por ser compañero de vida y aguantarme en las buenas y en las malas. Este último año ha sido un poco difícil, pero tú lo has hecho mucho más llevadero. Gracias por tu apoyo incondicional. Te quiero.

Por último, dar las gracias a mis padres, a mi hermano Javi y a mi tía Mayí. A mis padres, porque sin ellos y su gran apoyo nunca hubiera llegado hasta aquí. Gracias por inculcarme desde bien pequeña que, si uno se esfuerza, todo se puede. A mi hermano **Javi**, gracias por cuidar siempre de mí y ser un referente, porque no hay persona que yo más admire. A mi tía **Mayí**, de no ser por ella no estaría en este mundo de la ciencia. Esta tesis es tan vuestra como mía. Os quiero con toda mi alma.

Proyectos

La presente disertación se presenta como requisito para el grado de *Philosophiae Doctor* (PhD) por la Universidad de Murcia (España). Los estudios aquí recopilados se llevaron a cabo durante un período de tres años y fueron financiados por los siguientes proyectos:

Nacionales:

“*Modulación de la inflamación, microbiota y adiposidad de peces marinos mediante el uso de aditivos en la dieta*”. Referencia: AGL2017-83370-C3-1-R. Institución financiadora: Ministerio Nacional de Economía, Industria y Competitividad (MINECO) cofinanciado con Fondos FEDER. Periodo: 01/01/2018-30/06/2021. Investigadora responsable: Esteban, M.Á.

“*Mecanismos moleculares implicados en el carácter probiótico de *Shewanella putrefaciens Pdp11 (SpPdp11)**”. Referencia: AGL-2017-83370-C3-3-R. Institución financiadora: Ministerio Nacional de Economía, Industria y Competitividad (MINECO) cofinanciado con Fondos FEDER. Periodo: 01/01/2018-30/06/2021. Investigador responsable: Moriñigo, M.Á.

Regionales:

“*Mejora de la producción de la acuicultura mediterránea mediante el uso de herramientas biotecnológicas*”. Referencia: 19883/GERM/15. Institución financiadora: Fundación Séneca de la Región de Murcia. Periodo: 01/01/2016-31/12/2021. Investigadores responsables: García-Ayala, A. y Meseguer, J.

Publicaciones

Publicaciones derivadas de la presente tesis (3):

Cámara-Ruiz, M., Cerezo, I.M., Guardiola, F.A., García Beltrán, J.M., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Esteban, M.A. (2021). Alteration of the immune response and the microbiota of the skin during a natural infection of *Vibrio harveyi* in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Microorganisms*, 9, 964.

Cámara-Ruiz, M., García-Beltrán, J.M., Cerezo, I.M., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Esteban, M.A. (2021). Immunomodulation and skin microbiota perturbations during an episode of chronic stress in gilthead seabream. *Fish and Shellfish Immunology* (aceptado 8-Feb-2022).

Cámara-Ruiz, M., Cerezo, I.M., Moriñigo, M.A., Esteban, M.A. Host-associated bacterial core in gastrointestinal tract and faeces of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* (enviado 30-Nov-2021)

Otras publicaciones/colaboraciones relacionadas (4):

Cámara-Ruiz, M., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Esteban, M.A. (2020). Probiotic *Shewanella putrefaciens* (SpPdp11) as a fish health modulator: A review. *Microorganisms*, 8, 1990.

Cámara Ruiz, M., García Beltrán, J.M., Guardiola, F.A., & Esteban, M.A. (2020). *In vitro* and *in vivo* effects of purslane (*Portulaca oleracea* L.) on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *AIMS Agriculture and Food*, 5(4): 799-824.

Cámara-Ruiz, M.C., Espírito Santo, C., Mai, A., Gessner, J., Wuertz, S. (2019). Can juvenile Baltic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) smell the enemy? *Journal of Applied Ichthyology*, 35: 835-842.

Cámara-Ruiz, M.C., Espírito Santo, C., Gessner, J., Wuertz, S. (2018). How to improve foraging efficiency for restocking measures of juvenile Baltic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*). *Aquaculture*, 502: 12-17.

Trabajos presentados en conferencias o congresos (5):

Cámara-Ruiz, M., Cerezo, I.M., Guardiola, F.A., García Beltrán, J.M., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Esteban, M.A. (2020). “Mucosal immune response and microbiota modulation during a natural infection of *Vibrio Harveyi* in European seabass (*Dicentrarchus labrax*)”. Póster en el Congreso Aquaculture Europe, 12-15 abril 2020. Virtual.

Cámara Ruiz, M., García Beltrán J.M., Ceballos-Francisco D., Mayor Lafuente J., Esteban Abad M.A. (2020). “Impact of chronic stress on growth performance and immunity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)”. Comunicación oral en el VIII Congreso Ibérico de Ictiología SIBIC, 15-19 junio 2020. Virtual.

Cámara-Ruiz, M., Cerezo, I.M., Guardiola, F.A., García Beltrán, J.M., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Esteban, M.A. (2021). “Modulación de la microbiota en la mucosa de la piel de lubina (*Dicentrarchus Labrax*) tras una infección causada por *Vibrio harveyi*”. Comunicación oral en las VI Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia, España, 24 de junio 2021.

Cámara-Ruiz, M., García-Beltrán J.M., Cerezo I.M., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Esteban, M.A. (2021). “Skin mucus microbiota alteration in *Sparus aurata* during an episode of chronic stress”. Comunicación oral en la XX Conferencia Internacional sobre enfermedades de peces y crustáceos, 20-23 septiembre 2021. Virtual.

Vicente, S., Sridhar, A., Mayor-Lafuente, J., **Cámara-Ruiz, M.**, Esteban, M.A., Guardiola, F.A. (2021). Expression of immune-related genes in European eel (*Anguilla anguilla*) after bacterial challenges. Aquaculture Europe, 2021, Madeira.

ÍNDICE

| | |
|-----------------------|----|
| Lista de abreviaturas | I |
| Índice de figuras | V |
| Índice de tablas | XI |

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1. La microbiota de los peces teleósteos | 8 |
| 1.1. Ontogenia de la microbiota de peces | 11 |
| 1.2. Microbiota asociada a diferentes regiones corporales | 12 |
| 1.2.1. Tracto gastrointestinal | 13 |
| 1.2.2. Piel | 14 |
| 1.2.3. Branquias | 15 |
| 1.3. Funciones de la microbiota | 16 |
| 1.3.1. Nutrición / Digestión | 16 |
| 1.3.2. Respuesta inmunitaria | 17 |
| 1.3.4. Reproducción | 18 |
| 1.4. Factores que afectan a la microbiota | 19 |
| 1.5. Técnicas de estudio | 20 |
| 1.6. Importancia de la microbiota en la piscicultura | 23 |
| OBJETIVOS | 24 |

| | |
|--|------------|
| CAPÍTULO 1. Modulación de la inmunidad y de la microbiota del moco de la piel de dorada (<i>Sparus aurata</i>) durante un episodio de estrés crónico | 29 |
| 1. Resumen | 30 |
| 2. Resumen gráfico | 31 |
| 3. Introducción | 32 |
| 4. Materiales y métodos | 33 |
| 5. Resultados | 43 |
| | |
| CAPÍTULO 2. Modulación de la respuesta inmunitaria (sistémica y local) y de la microbiota en la mucosa de la piel de lubina (<i>Dicentrarchus Labrax</i>) tras una infección causada por <i>Vibrio harveyi</i>. | 59 |
| 1. Resumen | 60 |
| 2. Resumen gráfico | 61 |
| 3. Introducción | 62 |
| 4. Materiales y métodos | 62 |
| 5. Resultados | 68 |
| | |
| CAPÍTULO 3. Microbiota asociada al hospedador en el tracto gastrointestinal y las heces de la dorada (<i>Sparus aurata</i>). | 81 |
| 1. Resumen | 82 |
| 2. Resumen gráfico | 83 |
| 3. Introducción | 84 |
| 4. Materiales y métodos | 86 |
| 5. Resultados | 89 |
| | |
| DISCUSIÓN GENERAL | 99 |
| | |
| CONCLUSIONES | 121 |
| | |
| BIBLIOGRAFÍA | 123 |

Lista de abreviaturas

| | |
|---------|---|
| A | Adenina |
| ACTH | Hormona adrenocorticotrópica |
| ADL | Análisis discriminante lineal |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNr | ADN ribosomal |
| ANOVA | Análisis de la varianza |
| APROMAR | Asociación Empresarial de Acuicultura de España |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| C | Citosina |
| CFU | Unidades formadoras de colonias |
| CRH | Hormona liberadora de corticotropina |
| CTAB | Bromuro de cetiltrimetilamonio |
| DGGE | Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| dNTPs | Desoxinucleótidos Trifosfatos |
| DO | Densidad óptica |
| ELISA | Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas |
| FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura |
| FISH | Hibridación fluorescente <i>in situ</i> |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| FMM | Medio <i>Flexibacter maritimus</i> |
| Forward | F |
| FSC | Dispersión frontal |
| G | Guanina |
| GALT | Tejido linfoide asociado al intestino |
| GI | Gastrointestinal |

| | |
|---------|--|
| GSI | Índice gonadosomático |
| HBSS | Solución salina equilibrada de Hank |
| HPA | Eje hipotalámico-pituitario-adrenal |
| HPC | Eje hipotalámico-pituitario-cromafin |
| IAP | Fosfatasa alcalina intestinal |
| IgD | Inmunoglobulina D |
| IgM | Inmunoglobulina M |
| Igs | Inmunoglobulinas |
| IgT/Z | Inmunoglobulina T/Z |
| LAB | Bacterias del ácido láctico |
| LEFSe | Análisis discriminante lineal, efecto-tamaño |
| LPS | Lipopolisacáridos |
| MAMPS | Patrones moleculares asociados a microbios |
| MTT | Dimetiltiazol |
| MyD88 | Proteína a la respuesta primaria diferenciación mieloide |
| NGS | Secuenciación de nueva generación |
| NMDS | Escala multidimensional no métrica |
| OTU | Unidad taxonómica operativa |
| pb | Pares de bases |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PBS-T | Tampón fosfato salino-Tween |
| PCR | Reacción en cadena polimerasa |
| PEG | Polietilenglicol |
| PMA | Acetato de miristato de forbol |
| qPCR | PCR cuantitativa a tiempo real |
| RC | Riñón cefálico |
| Reverse | R |
| RM | Riñón medio |
| SEM | Media del error estándar |
| SGR | Tasa de crecimiento específico |

| | |
|-------|--|
| sRPMI | Medio de cultivo RPMI-1640 |
| SSC | Dispersión lateral |
| T | Timina |
| TGGE | Electroforesis en gel con gradiente de temperatura |
| TLR4 | Receptor tipo Toll4 |
| TMB | Tetrametilbencidina |
| TSA | Agar tripticasa de soja |
| TSB | Caldo de soja tripticaseína |
| WG | Ganancia de peso |

Índice de figuras

| Número | Leyenda | Página |
|-----------------|--|-----------|
| Figura 1 | Producción acuícola mundial 1990-2018 (FAO, 2020) | 5 |
| Figura 2 | Representación gráfica de las definiciones de microbiota y microbioma. | 8 |
| Figura 3 | Principales filos bacterianos encontrados en las regiones asociadas a mucosas de peces. | 12 |
| Figura 4 | Factores intrínsecos y extrínsecos que pueden modular la microbiota de los peces teleósteos y su impacto en el huésped. | 20 |
| Figura 5 | Esquema del complejo ribosómico y del gen ARNr 16S. Los cuadros azul claro y azul oscuro indican regiones conservadas y regiones hipervariables (V1-V9) respectivamente. | 24 |
| Figura 6 | Niveles totales de glucosa (A), lactato (B) y cortisol (C) en suero de dorada (<i>Sparus aurata</i>) de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S). | 45 |
| Figura 7 | Niveles totales de glucosa (A), lactato (B) y cortisol (C) en moco de la piel de dorada (<i>Sparus aurata</i>) de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S). | 46 |
| Figura 8 | Parámetros inmunitarios en el moco de la piel de ejemplares de dorada (<i>Sparus aurata</i>) de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S). Proteínas totales (A), inmunoglobulinas totales (B), niveles de IgM (C) y actividad peroxidasa (D). | 49 |

| Número | Leyenda | Página |
|------------------|---|-----------|
| Figura 9 | Parámetros inmunitarios en el moco de la piel de dorada (<i>Sparus aurata</i>) de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S). Actividad lisozima (A) y actividad bactericida contra <i>V. harveyi</i> (B) y <i>V. anguillarum</i> (C). | 49 |
| Figura 10 | Curvas de rarefacción obtenidas a partir de datos de secuenciación de muestras de moco de la piel de dorada (<i>Sparus aurata</i>) de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S). | 50 |
| Figura 11 | Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las muestras de moco de la piel de dorada (<i>Sparus aurata</i>) de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S) en los diferentes tiempos experimentales (0, 14 y 28 días). | 52 |
| Figura 12 | Abundancia relativa media (%) a nivel de filo por grupos de las muestras de moco de la piel de dorada (<i>Sparus aurata</i>) de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S). ETC incluye taxones con menor abundancia 1%. | 53 |
| Figura 13 | Abundancia relativa media (%) a nivel de clase por grupos de las muestras de moco de la piel de dorada (<i>Sparus aurata</i>) de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S). ETC incluye taxones con menor abundancia 1%. | 54 |
| Figura 14 | Abundancia relativa media (%) a nivel de género por grupos de las muestras de moco de la piel de dorada (<i>S. aurata</i>) de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S). ETC incluye taxones con menor abundancia 1%. | 55 |

| Número | Leyenda | Página |
|------------------|---|-----------|
| Figura 15 | Diferencias significativas de la prueba t ($p < 0,05$) en los diferentes niveles taxonómicos. Se representaron los valores relativos a los medios de abundancia de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S) a los 14 días. | 56 |
| Figura 16 | Diferencias significativas de la prueba t ($p < 0,05$) en los diferentes niveles taxonómicos. Se representaron los valores relativos a los medios de abundancia de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S) a los 28 días. | 57 |
| Figura 17 | Fotografías de ejemplares representativos de lubinas (<i>Dicentrarchus labrax</i>) pertenecientes a los grupos no infectado (A-C) o infectado (D-F). | 68 |
| Figura 18 | Respuesta inmunitaria en suero de lubinas (<i>Dicentrarchus labrax</i>) no infectadas (NI) o infectadas (I). Niveles totales de inmunoglobulinas (A) e IgM (B). | 70 |
| Figura 19 | Respuesta inmunitaria en suero de lubinas (<i>Dicentrarchus labrax</i>) no infectadas (NI) o infectadas (I). Resultados de peroxidasa (A), lisozima (B), proteasa (C) y antiproteasa (D). | 71 |
| Figura 20 | Respuesta inmunitaria del moco de la piel en lubinas (<i>Dicentrarchus labrax</i>) no infectadas (NI) e infectadas (I). Niveles totales inmunoglobulinas (A) e IgM (B). | 71 |
| Figura 21 | Respuesta inmunitaria del moco de la piel en lubinas (<i>Dicentrarchus labrax</i>) no infectadas (NI) e infectadas (I). Actividades peroxidasa (A), lisozima (B) y proteasa (C). | 72 |

| Número | Leyenda | Página |
|------------------|---|-----------|
| Figura 22 | Curvas de rarefacción obtenidas de los datos de secuenciación de las distintas muestras de moco de la piel de lubinas (<i>Dicentrarchus labrax</i>) no infectadas (NI) o infectadas (I). | 73 |
| Figura 23 | Métricas de diversidad alfa. Índice Chao1 (A), índice de Shannon-Wiener (B), e índice inverso de Simpson (C) en la microbiota del moco de la piel de lubinas (<i>Dicentrarchus labrax</i>) no infectadas (NI) e infectadas (I). | 74 |
| Figura 24 | Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) en la microbiota del moco de la piel de lubinas (<i>Dicentrarchus labrax</i>) no infectadas (rojo) e infectadas (verde). | 75 |
| Figura 25 | Abundancia relativa (%) de bacterias a nivel de filo en el moco de la piel de lubinas (<i>Dicentrarchus labrax</i>) no infectadas (NI) e infectadas (I). | 76 |
| Figura 26 | Abundancia relativa (%) de bacterias a nivel de clase en el moco de la piel de lubinas (<i>Dicentrarchus labrax</i>) no infectados (NI) e infectados (I). | 77 |
| Figura 27 | Abundancia relativa (%) de bacterias a nivel de género en el moco de la piel de lubinas (<i>Dicentrarchus labrax</i>) no infectadas (NI) e infectadas (I). | 78 |
| Figura 28 | Análisis discriminante lineal (ADL) del efecto del tamaño (LEfSe) de la microbiota de moco de la piel de lubinas (<i>Dicentrarchus labrax</i>) no infectadas (NI) e infectadas (I) con <i>Vibrio harveyi</i> . | 79 |
| Figura 29 | Curvas de rarefacción obtenidas a partir de datos de secuenciación de las diferentes muestras de intestino posterior (IP) y heces (H) de dorada (<i>Sparus aurata</i>). | 89 |

| Número | Leyenda | Página |
|------------------|--|-----------|
| Figura 30 | Métricas de diversidad alfa (chao1, Shannon, InvSimpson) en el intestino posterior (IP) y en las heces (H) de dorada (<i>Sparus aurata</i>). | 90 |
| Figura 31 | Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) en el intestino posterior (IP) y en las heces (H) de dorada (<i>Sparus aurata</i>). | 91 |
| Figura 32 | Abundancia relativa (%) de bacterias a nivel de filo (A) y clase (B) identificadas en el intestino posterior (IP) y en las heces (H) de dorada (<i>Sparus aurata</i>). | 93 |
| Figura 33 | Abundancia relativa (%) de bacterias a nivel de familia (A) y género (B) identificadas en el intestino posterior (IP) y en las heces (H) de dorada (<i>Sparus aurata</i>). | 95 |
| Figura 34 | Análisis discriminante lineal (ADL) del efecto del tamaño (LEfSe) de la microbiota del intestino posterior (IP) y de las heces (H) de dorada (<i>Sparus aurata</i>). | 96 |

Índice de tablas

| Número | Leyenda | Página |
|----------------|---|-----------|
| Tabla 1 | Resumen de los resultados del análisis estadístico (ANOVA mixto) de los datos (crecimiento, parámetros de estrés e inmunitarios) obtenidos en este estudio. | 43 |
| Tabla 2 | Tasa de crecimiento específico (SGR) y porcentaje de ganancia de peso (%WG) obtenidos de las biometrías de doradas (<i>Sparus aurata</i>) de los grupos experimentales: control (C) y crónicamente estresado (S). | 44 |
| Tabla 3 | Actividades inmunitarias celulares en leucocitos aislados a partir del riñón cefálico de dorada (<i>Sparus aurata</i>) de los grupos experimentales: control (C) y crónicamente estresado (S). Capacidad y habilidad fagocítica, explosión respiratoria y actividad peroxidasa. | 46 |
| Tabla 4 | Actividades y parámetros inmunitarios humorales en suero de dorada (<i>Sparus aurata</i>) de los grupos experimentales: control (C) y crónicamente estresado (S). Proteínas totales, inmunoglobulinas totales, inmunoglobulina M, actividad peroxidasa y actividad lisozima. | 47 |
| Tabla 5 | Índices de diversidad alfa por grupos control (C) y crónicamente estresado (S). | 51 |
| Tabla 6 | Cepas bacterianas aisladas a partir de úlceras de la piel, de riñón medio y cefálico de lubinas (<i>D. labrax</i>) con signos de infección. | 69 |

Resumen

La microbiota asociada a las mucosas (intestino, piel, branquia y narinas, mayoritariamente) de los peces teleósteos desempeña un papel crucial en diversas funciones fisiológicas tales como la digestión, el desarrollo y crecimiento o la defensa inmunitaria. Por este motivo, el número de estudios relacionados con la microbiota y su funcionalidad en especies de interés acuícola han aumentado en los últimos años. Conocer y entender la microbiota de los peces domesticados es de gran utilidad tanto para la mejora de la productividad de la industria como para el progreso de la sostenibilidad del sector.

Esta Tesis Doctoral, está dividida en tres capítulos, una discusión general y unas necesarias conclusiones que responden a los objetivos planteados durante el desarrollo del programa doctoral.

El interés de este trabajo es aportar conocimiento al incipiente campo de estudio de la microbiota de algunos de los peces marinos cultivados en la zona mediterránea, en concreto de la dorada y de la lubina. Para el estudio de la microbiota asociada a distintas regiones corporales de estos animales (fundamentalmente del tracto gastrointestinal y del moco de la piel) se han utilizado diversas técnicas de biología molecular, tanto del campo de la microbiología como de la inmunología, teniendo en cuenta desde el diseño de los experimentos la preferencia por el uso de métodos no invasivos que garanticen el bienestar de los animales sujetos a experimentación.

En el **Capítulo 1** se analizaron los cambios en el sistema inmunitario sistémico y local y en la diversidad de la microbiota del moco de la piel durante un episodio de estrés crónico en dorada (*S. aurata*). Además, se analizaron parámetros de estrés y crecimiento. En este experimento, no se encontraron diferencias en los indicadores de estrés (glucosa, lactato, cortisol) ni en suero, ni en el moco de la piel. La inmunidad celular y sistémica no se vio afectada. Por el contrario, se obtuvieron diferencias significativas en los parámetros inmunitarios locales. Se observó un aumento en el nivel de inmunoglobulinas totales (Igs) y en la actividad peroxidasa, mientras que se detectó una disminución significativa en los niveles totales de inmunoglobulinas M (IgM) en el moco de la piel de los peces crónicamente

estresados con respecto a los peces no estresados. En cuanto a la riqueza y diversidad microbiana, se observó un aumento significativo tanto en la riqueza como en la diversidad de las comunidades microbianas en los peces crónicamente estresados después de los 14 días de exponerlos a la situación de estrés. Por otro lado, el análisis de diversidad beta demostró que hubo diferencias significativas entre ambas comunidades bacterianas, especialmente a los 14 días. Los resultados de taxonomía indicaron un aumento en la abundancia de especies bacterianas con potencial capacidad de controlar la proliferación de especies patógenas y una disminución en especies consideradas oportunistas. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la alta sensibilidad de la mucosa de piel y la tendencia a proteger el tejido tanto del sistema inmunitario como de la microbiota local frente a las alteraciones provocadas por un agente estresante.

En el **Capítulo 2**, con el fin de determinar su uso como posibles biomarcadores de salud/enfermedad en lubina (*Dicentrarchus labrax*), se examinaron las variaciones en la microbiota del moco de la piel frente a las alteraciones del sistema inmunitario (sistémico y local) tras una infección bacteriana causada por *Vibrio harveyi*. En este experimento, se detectó una disminución significativa de la actividad proteasa tanto en la inmunidad sistémica como en la local en los peces infectados en comparación con los peces no infectados. Adicionalmente, se observó una disminución significativa en la actividad lisozima y un aumento significativo en la actividad peroxidasa en la inmunidad local en peces infectados. Con respecto a la riqueza y diversidad bacteriana, los resultados mostraron un aumento significativo en la diversidad bacteriana en los peces infectados. Por otro lado, la diversidad beta indicó que las comunidades bacterianas de peces infectados y no infectados eran significativamente diferentes. Para terminar, el análisis discriminante lineal (ADL), efecto-tamaño (LEfSe) para detectar biomarcadores determinó que los biomarcadores asociados a los peces infectados fueron principalmente Proteobacterias (*V. harveyi*) para el grupo de los infectados mientras que Verrucomicrobia (específicamente el género *Rubritalea*) se asoció especialmente con el grupo no infectados. Como conclusión, los resultados de este experimento sugieren el papel temprano que juegan en la infección por vibriosis tanto la proteasa como la lisozima del moco de la piel. El análisis de la composición de la microbiota sugiere una posible disbiosis en los peces infectados, ya que existe una alteración tanto de composición como funcional. Además, el análisis LEfSe detectó a *V. harveyi* como biomarcador del grupo infectado, demostrando su potencial como herramienta para la detección de infecciones.

Para finalizar, en el **Capítulo 3** se estudió la posibilidad de utilizar contenido fecal, en lugar de tejido intestinal posterior como método no invasivo, para determinar la composición microbiana del tracto gastrointestinal de la dorada (*Sparus aurata*). Los resultados obtenidos demostraron que no existen diferencias significativas entre la composición bacteriana del tejido intestinal en comparación con la de las heces tanto en diversidad y riqueza como en taxonomía, poniendo de manifiesto la posibilidad de utilizar esta matriz y así evitar el sacrificio animal cuando no sea estrictamente necesario.

Introducción

La acuicultura es el sector de producción de alimentos con el crecimiento más rápido del mundo, habiendo contribuido casi a la mitad del consumo mundial de productos acuáticos durante las últimas cuatro décadas (Tveteras y col., 2012). Según las últimas estadísticas mundiales sobre acuicultura de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción acuícola alcanzó otro máximo histórico de 114,5 millones de toneladas en peso vivo en 2018. La producción total consistió en 82,1 millones toneladas de animales acuáticos y 32,4 millones de toneladas de algas acuáticas, entre otros (FAO, 2020). La producción mundial de animales acuáticos creció un 5,3 % de promedio por año en el período de 2001-2018, mientras que el crecimiento fue de sólo un 4 % en 2017 y un 3,2 % en 2018 (Fig. 1). La baja tasa de crecimiento reciente fue causada por la desaceleración en China, el mayor productor, donde la producción acuícola creció sólo un 2,2 % en 2017 y un 1,6 % en 2018, mientras que la producción del resto del mundo todavía disfrutaba de un crecimiento moderado de un 6,7 % y un 5,5 % respectivamente, en esos mismos años (FAO, 2020).

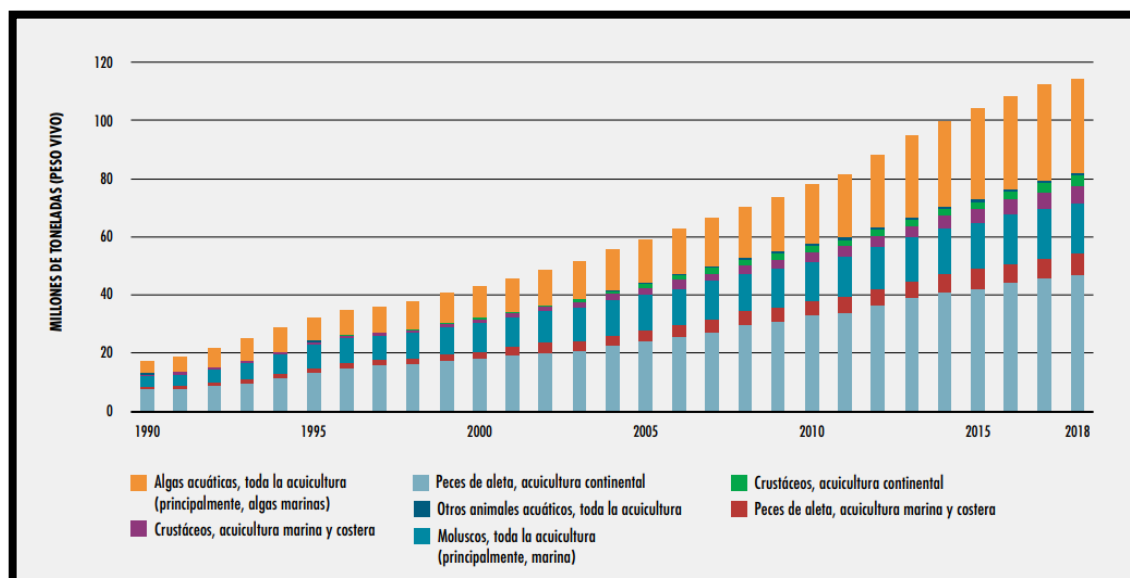


Figura 1. Producción acuícola mundial 1990-2018 (FAO, 2020).

La producción acuícola en España alcanzó un total de 342.867 toneladas. Atendiendo a las estadísticas más recientes recopiladas por la Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR), esta producción alcanzó un valor en su primera venta de 501 millones de euros (APROMAR, 2020). La principal especie producida fue el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) (261.513 t), seguido por la lubina (*D. labrax*) (27.335 t), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (18.955 t) y la dorada (*S. aurata*) (13.521 t). La Comunidad Valenciana ha encabezado la producción de dorada de acuicultura en España con 6.629 t (el 49 % del total), seguida por Murcia (2.906 t, el 21,5 %), Canarias (2.380 t, el 17,6 %) y Andalucía (1.606 t, el 11,9 %). Con respecto a la cosecha de lubina de acuicultura en España en 2019 ha sido un 21,7 % más que en 2018. La Región de Murcia ha encabezado la producción con 9.181 toneladas (el 34 % del total), seguida por Andalucía (7.120 t, el 26 %), Canarias (6.253 t, el 23 %), la Comunidad Valenciana (4.751 t, el 17 %), y Cataluña (30 t, el 0,1 %) (APROMAR, 2020).

Desafortunadamente, la creciente demanda de productos acuáticos, debido en gran parte al crecimiento exponencial de la población mundial, ha dado lugar a una intensificación de la industria que inevitablemente afecta el bienestar de los animales en los sistemas acuícolas (Ashley, 2007). A medida que la acuicultura intensifica su producción, las densidades de población en las jaulas aumentan considerablemente y, con ello, problemas de bienestar animal entre los cuales destacan un alto nivel de estrés y brotes asociados con agentes patógenos (Pulkkinen y col., 2010). Los brotes de enfermedades causados por el cultivo intensivo en la acuicultura han resultado en graves pérdidas económicas para los productores (Ali y col., 2020). Una de las principales razones por las que se producen es el alto grado de estrés al que se encuentran sometidos estos animales. En la práctica, los estímulos estresantes en la acuicultura tienen múltiples orígenes tales como el manejo, la clasificación, el transporte o el hacinamiento (Ashley, 2007). Por lo tanto, la producción intensiva en acuicultura requiere ambientes cuidadosamente monitorizados y controlados, de lo contrario podría implicar tener animales constantemente estresados, comprometiendo su salud y supervivencia (Ashley, 2007).

Históricamente, los antibióticos (mayormente sulfonamidas y tetraciclinas) se han utilizado para prevenir y tratar enfermedades en las instalaciones acuícolas comerciales. A día de hoy, una gran variedad de químicos se utilizan también en la producción acuícola tales como desinfectantes (peróxido de hidrógeno y verde malaquita) o agentes antihelmínticos

(Rawn y col., 2009). Sin embargo, la constante preocupación sobre el uso de estos compuestos por los problemas de salud pública que conllevan, tales como la aparición de transferencias de reservorios de bacterias resistentes a antibióticos o la acumulación de residuos antimicrobianos en productos derivados de la acuicultura o en el medio ambiente, han llevado a la búsqueda de alternativas tales como inmunoestimulantes naturales. Estos inmunoestimulantes incluyen probióticos o prebióticos, los cuáles son capaces de estimular el sistema inmunitario activando o incrementando la actividad de uno o varios de sus componentes además de estimular la microbiota asociada al epitelio del tracto gastrointestinal (GI) la cual participa en la asimilación de nutrientes y en la defensa contra patógenos entre otros modos de acción (Akhter y col., 2015; Bermudez-Brito y col., 2012; Vaseeharan y Thaya, 2014).

El bienestar de los peces en la acuicultura se puede medir a través de varios parámetros fisiológicos y conductuales. Estos indicadores se pueden combinar útilmente para controlar el fenómeno del estrés/enfermedad y, con ello, la salud en general. En todo este escenario, el equilibrio de la microbiota es clave para mantener tanto la salud como la productividad de los peces (Gómez y Balcázar, 2008). Los animales son colonizados al nacer por comunidades complejas y dinámicas de microorganismos que participan en el metabolismo, desarrollo, sistema inmunitario entre otras funciones y, por lo tanto, la microbiota no debe ser ignorada cuando evaluamos y gestionamos la salud de los animales (Marques y col., , 2006; O'Hara y Shanahan, 2006).

Teniendo en cuenta lo expuesto previamente, conocer, comprender y manipular adecuadamente las interacciones microbiota-huésped-ambiente podría contribuir sustancialmente a lograr una industria acuícola más sostenible y a solucionar ciertos desafíos a los que se enfrenta.

1. La microbiota de los peces teleósteos

Los organismos proporcionan una amplia variedad de nichos ecológicos en los que las condiciones ambientales (temperatura, pH, nivel de oxígeno, etc.) así como la disponibilidad de nutrientes, afectan la composición de la microbiota que allí reside. Todos los organismos pluricelulares o multicelulares se benefician de su propia microbiota, la cual juega un papel crucial en el mantenimiento de la salud del hospedador. Por definición, la microbiota consiste en el ensamblaje de microorganismos que pertenecen a diferentes reinos (bacterias, arqueas, hongos, virus) mientras que el microbioma se define como la colección de genes de una comunidad microbiana característica que ocupa un hábitat bien caracterizado. Éste no solo se refiere a los microorganismos involucrados, sino que también engloba su teatro de actividad, resultando en la formación de nichos ecológicos específicos (**Fig. 2**).

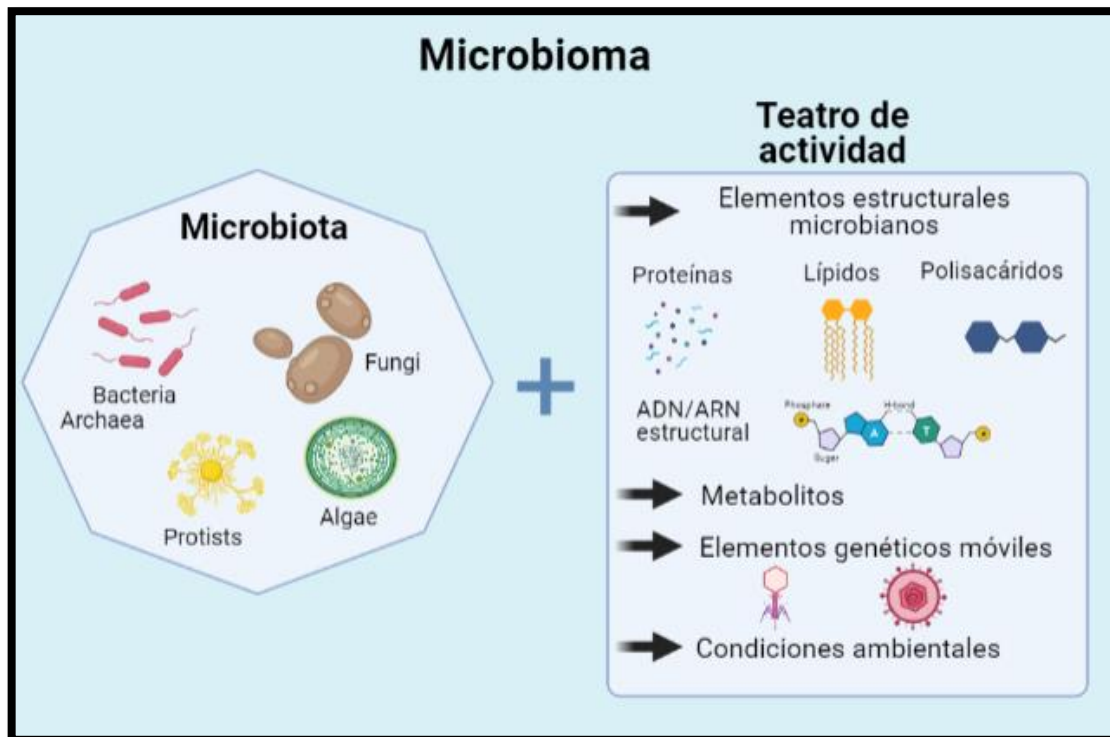


Figura 2. Representación gráfica de las definiciones de microbiota y microbioma.

En humanos, cobra fuerza un nuevo paradigma microbiológico que postula una microbiota sana o normal como requisito para la salud. En estos estudios, el mantenimiento de una microbiota sana suele estar vinculado a la prevención de enfermedades infecciosas y

a la producción de aminoácidos y vitaminas esenciales para su homeostasis (Lloyd-Price y col., 2016). Tal mutualismo huésped-bacteria se ha documentado en otros modelos animales como ratones, pollos, cerdos, vacas, insectos y vertebrados marinos (Brugman y col., 2018; Hacquard y col., 2015; Ikeda-Ohtsubo y col., 2018; Mao y col., 2015). El número de trabajos sobre la microbiota de animales terrestres, peces y plantas crece exponencialmente y existen altas expectativas sobre la mejora de la productividad y la sostenibilidad en las diferentes industrias a través de su manipulación (Ikeda-Ohtsubo y col., 2018). Si bien esta manipulación es una estrategia prometedora para abordar ciertos temas, es un requisito previo para los investigadores interpretar y explotar los conjuntos de datos de manera rápida y eficaz con una visión más generalizada que la que se ha tenido hasta ahora.

Los peces tienen una interacción única e íntima con el entorno que los rodea y, a su vez, con los microorganismos con los que coexisten. La microbiota de los peces puede ser muy diversa, incluyendo protoctistas, hongos, virus, bacterias y arqueas (Merrifield y Rodiles, 2015). Sin embargo, las bacterias son la microbiota dominante en los tejidos mucosos de los peces y, hasta la fecha, han sido casi el único foco de investigación en este campo. Los primeros estudios de las comunidades microbianas en peces se remontan a finales de la década de 1920 (Harrison, 1929; Reed y Spence, 1929). Desde estas investigaciones pioneras, se ha dedicado mucho esfuerzo a describir las comunidades microbianas presentes en los peces teleósteos. Los primeros estudios utilizaron una gran variedad de medios de cultivo para describir las comunidades bacterianas presente usando pruebas fenotípicas y bioquímicas para su identificación. Las limitaciones de tales enfoques se han hecho evidentes en las últimas décadas al descubrir que la mayoría de los componentes de las comunidades microbianas son, en gran parte, no cultivables. De hecho, se estima que el porcentaje de microorganismos cultivables en el tracto GI de los peces no llega al 0,1% (Ghanbari y col., 2015; Nayak, 2010; Romero y col., 2014). Hoy en día, están disponibles una amplia variedad de técnicas (independientes del cultivo) para el análisis de la microbiota y han sido discutidas en detalle en algunas revisiones (Fraher y col., 2012). Brevemente, entre estas técnicas se incluyen: PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TTGE), electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) e hibridación fluorescente *in situ* (FISH). La secuenciación de nueva generación (NGS) es el último método de análisis molecular y está siendo utilizado cada vez más frecuencia en estudios sobre la microbiota de los peces, proporcionando

una mayor información sobre la abundancia y diversidad de la microbiota, así como el potencial genético y metabólico de las especies presentes (Ghanbari y col., 2015).

Al igual que en humanos y otros mamíferos, la microbiota simbiótica asociada a los peces desempeña un papel crucial en el aprovisionamiento nutricional, la homeostasis metabólica y la defensa inmunitaria (Gómez y Balcázar, 2008; Sullam y col., 2012). El estado de salud de los organismos acuáticos está altamente relacionado con su entorno, que puede contener altas concentraciones de microorganismos, como ya se comentó. Muchos de ellos son oportunistas y son capaces de infectar cuando las condiciones se vuelven favorables para su multiplicación. Sin embargo, en condiciones normales, los peces mantienen un estado de salud óptimo defendiéndose de estos potenciales invasores usando un vasto repertorio de mecanismos de defensa tanto innatos como adaptativos (Ellis, 2001).

Las mucosas de la piel, las branquias y el tracto GI son reconocidas como las principales vías de entrada de patógenos en los peces (Bøggwald y Dalmo, 2015; Ringø y col., 2007; Wilson y Laurent, 2002) y, como tal, la mayoría de los estudios se han centrado en las comunidades microbianas asociadas con estas regiones con un claro sesgo hacia el tracto GI. Las comunidades microbianas allí presentes son componentes clave de las defensas de las mucosas del huésped, estableciendo una interacción homeostática a través de la competencia por los sitios de adhesión y los nutrientes, lo que puede limitar o reducir la abundancia de patógenos (Merrifield y Rodiles, 2015). También pueden antagonizar con los patógenos mediante la producción de varios compuestos como ácidos orgánicos, sideróforos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y péptidos antimicrobianos (Merrifield y Rodiles, 2015).

Actualmente, la mayoría de los esfuerzos en investigación se han centrado en la secuenciación de comunidades bacterianas de diferentes especies acuícolas de interés y más concretamente en diferentes localizaciones corporales (Lowrey y col., 2015), etapas del desarrollo (Martin S. Llewellyn y col., 2016) o tras diferentes regímenes dietarios (Xia y col., 2014). Estos esfuerzos van dirigidos a una comprensión basada en la dinámica y las funciones de las comunidades microbianas en sus huéspedes, lo cual podría permitir una selección más profunda de organismos beneficiosos para lograr estrategias que desarrollen una acuicultura más sostenible.

1.1. Ontogenia de la microbiota de los peces

La comunidad microbiana presente en los huevos o en el embrión se denomina epibiota. La mayoría de las especies de peces ponen huevos que son fertilizados externamente en el ecosistema acuático. La superficie de los huevos consiste en una gruesa capa interna (zona radiata) y una fina capa externa (corión o zona pelúcida). El corión se compone de moléculas similares a la fibrina y glicoproteínas, que incluyen lectinas, a las que los microorganismos del entorno pueden adherirse y colonizar (Geir, Hansen y Olafsen, 1999; Olafsen, 2001). Los peces teleósteos son colonizados poco después de su eclosión por un conjunto diverso de microorganismos que se encuentran en el agua circundante, la cual alberga comunidades microbianas que entran en contacto con los huevos/embriones. Los embriones de peces secretan compuestos orgánicos de bajo peso molecular a través del corión, que puede establecer un gradiente atrayendo microbios capaces de utilizar los compuestos secretados (Merrifield y Rodiles, 2015).

La colonización y el crecimiento bacteriano en los huevos de peces representan un gran problema para la cría de varias especies marinas, ya que debido a las técnicas intensivas de incubación a menudo dan como resultado huevos sobrecrecidos por bacterias, que pueden afectar la relación comensal entre la microbiota indígena y los oportunistas, pudiendo llegar a obstaculizar el desarrollo del huevo y su eclosión, o la salud y el crecimiento de las larvas (Hansen y Olafsen, 1999). Diversos estudios han investigado las comunidades asociadas con huevos y embriones, pero se han centrado típicamente en caracterizar patógenos potenciales, en lugar de dilucidar la identidad y las funciones de las comunidades comensales o mutualistas (Hansen y Olafsen, 1999; Olafsen, 2001).

1.2. Microbiota asociada a regiones corporales

En peces, la microbiota asociada al tracto GI ha sido la más estudiada hasta el momento y se ha caracterizado en muchas especies siendo Proteobacterias, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Fusobacteria los filos bacterianos más representados (Llewellyn y col., 2014) (**Fig 3**). Curiosamente, los peces albergan comunidades bacterianas diferentes en las distintas superficies del cuerpo, aunque por normal general, las Proteobacterias siguen siendo los filos más abundantes en todas ellas (Chiarello y col., 2015; Legrand y col., 2018; Llewellyn y col., 2014).

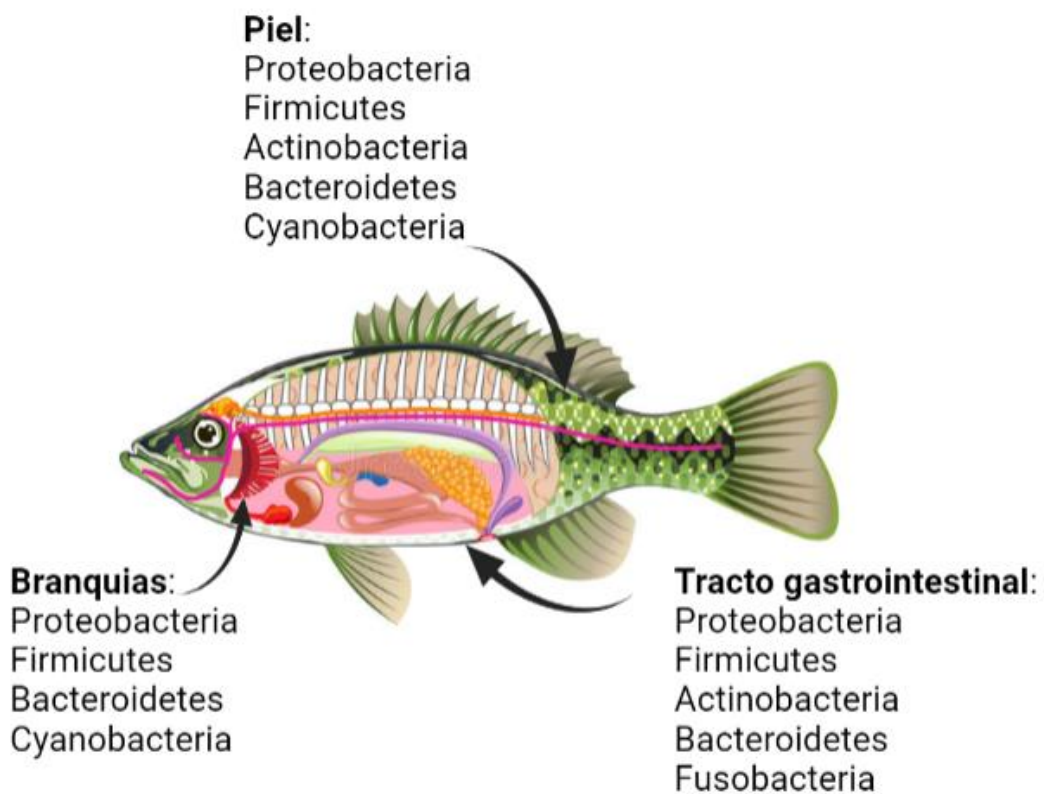


Figura 3. Principales filos bacterianos encontrados en las regiones asociadas a mucosas de peces.

1.2.1. Tracto gastrointestinal (GI)

Las investigaciones pioneras sobre la microbiota GI de los peces se remontan a principios de la mitad del siglo XX, pero más recientemente el interés en esta área ha crecido a un ritmo significativo coincidiendo con la expansión de la acuicultura. De hecho, los primeros trabajos sobre este tema se publicaron a finales de los años veinte y treinta (Reed y Spence, 1929) e investigaron la "flora mucosa" e intestinal de los peces. Hubo algunos estudios exploratorios adicionales durante las décadas de 1950 y 1960 donde Margolis (1953) investigó el efecto del ayuno mientras que Colwell y Liston (1962) examinaron la microbiota intestinal en general.

A principios de la década de 1990 se publicaron las primeras revisiones sobre este tema (Cahill, 1990; Ringø y col., 1995) proporcionando una descripción general completa de los estudios hasta esa fecha. Así, se puso de manifiesto que los niveles de bacterias en el intestino de los peces eran bajos y parecían derivarse del medio ambiente circundante o de la dieta (Cahill, 1990; Ringø y col., 1995). Estas conclusiones se obtuvieron sobre la base de investigaciones que utilizaron métodos dependientes del cultivo de las bacterias. Afortunadamente, las técnicas analíticas han evolucionado significativamente desde entonces y ahora se tiene constancia de que los microorganismos cultivables representan menos del 0,1% de la comunidad microbiana total en el tracto GI (Muyzer y Ramsing, 1995). La comunidad microbiana asociada al tracto GI puede ser subcategorizada en dos grupos principales: un grupo simplemente pasa a través del lumen con la comida (microbiota alóctona), mientras que el otro grupo es potencialmente residente y se encuentra íntimamente asociado a las superficies mucosas del huésped (microbiota autóctona).

Como se comentó con anterioridad, la microbiota del tracto GI puede ser muy diversa. Sin embargo, las bacterias son los microorganismos dominantes del intestino de los peces (Standen y col., 2015), siendo como ya se ha descrito anteriormente, las Proteobacterias el filo principal que se encuentra en el tracto GI de los peces marinos, seguido de los filos Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria y Fusobacteria (Llewellyn y col., 2014). De hecho, estos tres filos comprenden el 90% de la microbiota intestinal de las especies de peces teleósteos estudiados hasta el momento (Ghanbari y col., 2015).

Al igual que en los vertebrados superiores, la población más densa de microbios en peces teleósteos se encuentra en el tracto GI. La composición de la comunidad entre los diferentes tramos del tracto GI de los peces también puede variar (Llewellyn y col., 2014). Estudios iniciales ya encontraron un aumento del tamaño de la población que atraviesa distalmente a lo largo del tracto GI (Hansen y col., 1992; MacDonald y col., 1986; Molinari y col., 2003).

La microbiota de tracto GI de los peces con interés acuícola se ha convertido en un campo de investigación primordial, sin embargo y debido a su complejidad, su estructura y funcionalidad no se han estudiado en profundidad, por lo que la investigación en este campo facilitará la selección de probióticos, prebióticos y compuestos químicos con potencial para mejorar la homeostasis intestinal y la salud de los peces en acuicultura, que son alternativas prometedoras a los antibióticos (Dawood y Koshio, 2016; Hoseinifar y col., 2015).

1.2.2. Piel

Las primeras investigaciones sobre la microbiota asociada a la piel de peces se remontan también a la década de 1920. Esta primera investigación se realizó para determinar el papel de los microbios en el deterioro del pescado y, como tal, los recuentos microbianos y la identificación de los aislados se llevaron a cabo en muestras de piel epidérmica, músculo de pescado y "limo" epidérmico (es decir, moco) (Reed y Spence, 1929; Stewart, 1932). La capa mucosa del epitelio proporciona una protección mecánica y química actuando como barrera física contra agentes externos y organismos patógenos (Esteban, 2012). El moco de la piel contiene inmunoglobulinas, defensinas, lisozima, aglutininas similares a lectinas, y una variedad de péptidos antimicrobianos que proporcionan un amplio espectro de actividad antimicrobiana.

Algunas bacterias son positivamente quimiotácticas al moco de los peces (Klesius y col., 2008; Larsen y col., 2001) debido a que es rico en nutrientes y las bacterias son capaces de crecer en él (Benhamed y col., 2014). Sin embargo, desde la perspectiva del huésped, la adhesión bacteriana a la piel debe estar regulada para evitar la colonización excesiva y la interrupción de las funciones del tegumento. Esto se logra, probablemente en parte, por el desprendimiento constante de las capas superiores de la epidermis y la secreción continuada de moco. Las altas tasas de secreción de moco pueden eliminar eficazmente los microbios

de la epidermis (Esteban y Cerezuela, 2015). Por otro lado, muchas especies bacterianas están bien adaptadas para evadir o resistir los componentes inmunológicos del moco de la piel (Ringø y Holzapfel, 2000). Los componentes de este moco pueden ser metabolizados por algunos microbios que habitan en la mucosa en una relación mutualista entre los peces y su microbiota.

Se ha demostrado que la microbiota de la piel puede interferir con la colonización de patógenos (Olafsen, 2001; Olsson y col., 1992; Ringø y Olsen, 1999) por antagonismo y competencia por los sitios de adhesión y/o nutrientes (Balcázar y col. 2007; Pérez-Sánchez y col., 2017). Las poblaciones de bacterias en la superficie de los peces suelen ser similares a las del agua circundante (Nedoluha y Westhoff, 1997; Skjermo y Vadstein, 1993). Sin embargo, la composición de la microbiota de la piel de los peces sanos es diferente a la del agua y la riqueza microbiana puede ser mayor en el moco de la piel, como se reportó para el merlán (*Merlangius merlangus*) y el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Landeira-Dabarca y col., 2013; Smith y col., 2007).

Se ha informado de varios grupos de microorganismos como componentes en la microbiota de la piel; estos incluyen Proteobacterias (*Pseudomonadales*, *Enterobacteriales*, *Aeromonadales*, *Burkholderiales*, *Vibrionales*, *Rhizobiales*, *Rhodospirillales*, *Alteromonadales*, *Rickettsiales*, *Caulobacterales*, *Xanthomonadales*, *Neisseriales*, *Sphingomonadales*), Actinobacteria (*Actinomicetes* (*Bacillales*), *Firles* *Lactobacillales*, *Clostridiales*) y Bacteroidetes (*Bacteriodales*, *Flavobacteriales*, *Cytophagales*, *Sphingobacteriales*) entre otros (Gram y Ringø, 2005). Proteobacterias (dominadas por las γ -proteobacterias) es a menudo el filo más abundante encontrado en la piel de peces marinos (Larsen y col., 2013).

1.2.3. Branquias

Sigue habiendo escasez de información completa sobre las comunidades microbianas asociadas a las branquias de los peces, pero los datos que existen demuestran que soportan altas poblaciones de una amplia gama de bacterias (Horsley, 1977; Mudarris y Austin, 1988; Nedoluha y Westhoff, 1997; Ringø y Holzapfel, 2000; Trust, 1975). Además, es conocido que existe una microbiota no patógena con propiedades antibacterianas en la superficie mucosa de las branquias (Ringø y Holzapfel, 2000). Sin embargo, se ha sugerido que debido

a la corriente continua de agua pasando por las branquias, este órgano representa un hábitat difícil para los microbios y que la colonización microbiana está restringida a las áreas que se encuentran más protegidas, tales como fisuras entre los arcos faríngeos y las laminillas (Mudarris y Austin, 1988).

Son componentes habituales de la microbiota de las branquias de los peces varios grupos de microorganismos entre los que se incluyen Proteobacterias (*Pseudomonadales*, *Enterobacteriales*, *Aeromonadales*, *Vibrionales*, *Alteromonadales*, *Rhizobiales*, *Burkholderiales*, *Pasteurellales*, *Caulobacterales*, *Xanthomonadales*), Actinobacteria (*Actinomycetales*), Firmicutes (*Bacillales*, *Lactobacillales*, *Erysipelotrichales*) y Bacteroidetes (*Flavobacteriales*, *Bacteriodales*) (Gram y Ringø, 2005).

1.3. Funciones de la microbiota

1.3.1. Nutrición / Digestión

Se ha demostrado que la microbiota del tracto GI de los peces contribuye a la nutrición y a otros procesos fisiológicos del huésped mediante la producción de vitaminas, aminoácidos, enzimas digestivas y metabolitos, de manera similar a lo que ocurre en mamíferos (Ganguly y Prasad, 2012; Cahill, 1990; Sugita y col., 1997). Además, una amplia gama de enzimas como las carbohidrasas, fosfatasa, esterasas, lipasas, peptidasas, celulasa, y proteasas producidas por las bacterias que residen en el tracto GI podrían ser una fuente contributiva a las enzimas digestivas en los peces (Bairagi y col. 2002; Izvekova y Lapteva, 2004; Ramirez y Dixon, 2003). Por ejemplo, la presencia de una alta concentración de *Aeromonas* en el tracto GI puede conllevar que desempeñe un papel importante en la digestión, ya que algunas especies de *Aeromonas* secretan varios tipos de proteasas (Pemberton y col., 1997).

Otros estudios indican que las bacterias anaeróbicas podrían desempeñar un papel en la digestión y absorción de nutrientes (Ramirez y Dixon, 2003). Además, la capacidad de las bacterias (ya sean aeróbicas, anaeróbicas o anaeróbicas facultativas) para sintetizar diferentes vitaminas y aminoácidos en peces es notable (Limsuwan y Lovell, 1981; Sugita y col., 1991; Sugita y col., 1996). Entre ellas, la producción de vitamina B12 por bacterias gastrointestinales está bien documentada en peces (Sugita y col., 1991). Esta producción es diferente entre especies y está correlacionado con la abundancia de más bacterias anaeróbicas en comparación con aeróbicas en el tracto GI.

La microbiota del tracto GI desempeña un papel crucial en la nutrición del huésped estando involucrada en el metabolismo y la absorción de nutrientes, especialmente en el metabolismo y el tráfico del colesterol (Cebra, 1999; Falk y col., 1998). Diferentes estudios con modelo gnotobióticos han revelado que larvas de pez cebra (*Danio rerio*) gnotobióticas fracasan en la absorción de macromoléculas proteicas, con diferencias significativas en los niveles de farnesildifosfato sintasa y apolipoproteína B en comparación con las larvas convencionales (Bates y col., 2007). Además, también se ha demostrado la regulación ascendente microbiana de la apolipoproteína B. Esta proteína desempeña un papel fundamental en el tráfico intra- y extracelular del colesterol. Por otra parte, se ha observado la regulación descendente de la 7 α -hidrolasa en colesterol específico del hígado, la cual cataliza el primer paso en el catabolismo del colesterol y en la biosíntesis de ácidos biliares (Bates y col., 2007; Rawls y col., 2004).

1.3.2. Respuesta inmunitaria

Todos los lugares recubiertos por mucosa en los peces están colonizados por microbios que interactúan con el sistema inmunitario tanto innato como adaptativo (Esteban y Cerezuela, 2015). El mantenimiento exitoso de la homeostasis inmunológica en estos sitios permite que la microbiota viva como una extensión de la fisiología del propio hospedador, proporcionando funciones esenciales en el metabolismo de los nutrientes, el mantenimiento de las barreras mucosas y la protección frente a patógenos (Kelly y Salinas, 2017). Para mantener este equilibrio, los microbios deben suprimir o evadir el sistema inmunológico del huésped, que debe calibrarse para prevenir la infección por oportunistas, pero seguir siendo tolerante a un número natural y diverso de microbios que habitan esos nichos en el microambiente mucoso.

La microbiota ejerce efectos directos sobre el sistema inmunitario de teleósteos a través de patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs) y de la secreción de ciertos factores. De esta forma, la microbiota y sus moléculas secretadas pueden actuar localmente en el epitelio de la mucosa o sistémicamente si llegan a ingresar en la circulación del huésped o si activan las células inmunitarias que luego viajarán desde la mucosa hasta los tejidos linfoides. Además, estos microorganismos pueden ejercer efectos inmunoestimuladores o inmunosupresores sobre las células inmunitarias tanto innatas como adaptativas (Kelly y Salinas, 2017).

Tanto las respuestas inmunes innatas como las adaptativas regulan la colonización bacteriana de las superficies mucosas (Galindo-Villegas y col., 2012, Bates y col., 2007). Con respecto a las vías inmunes innatas, la señalización de la proteína a la respuesta primaria a la diferenciación mieloide 88 (MyD88) parece ser crítica en este proceso (Galindo-Villegas y col., 2012). La activación de esta vía se produce debido a la presencia de MAMPs en la microbiota que ejercen efectos inmunomoduladores innatos. Por ejemplo, en el pez cebra la detección de lipopolisacáridos (LPS), que son el mayor constituyente de las membranas externas de bacterias gramnegativas, puede inducir la expresión de la fosfatasa alcalina intestinal (IAP) a través del receptor de tipo Toll 4 (TLR4) y la señalización de MyD88. A su vez, IAP sirve para desintoxicar de LPS y mantener así la homeostasis intestinal (Bates y col., 2007). Con respecto a la inmunidad adaptativa, la microbiota presente en las superficies de la mucosa de los peces están recubiertos por inmunoglobulinas M, D y T/Z (IgM, IgD e IgT/IgZ) (Tacchi y col., 2014; Xu y col., 2013; Zhang y col., 2011).

1.3.3. Respuesta al estrés

El estrés se define como una condición en la cual el equilibrio dinámico de un organismo (homeostasis) se ve amenazada o perturbada como resultado de estímulos intrínsecos o extrínsecos, comúnmente llamados estresores (Chrousos y Gold, 1992). El estrés en los peces puede ser causado por toda una serie de factores ambientales (por ejemplo, mala calidad o altos niveles de ciertas partículas en el agua, fotoperiodo, niveles de oxígeno o de temperatura muy distintos al óptimo, presencia de algas o de otros microorganismos más alta de lo normal), o por situaciones desencadenadas por las condiciones actuales en las que se desarrolla la acuicultura, entre ellas alta densidad de población, mala dieta y/o desnutrición, así como transporte o manipulación indebida de los ejemplares (Wendelaar, 1997).

Cuando se produce estrés, el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) libera la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que estimula la secreción de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) de la hipófisis anterior que, a su vez, estimula la secreción de glucocorticoides suprarrenales para preparar al cuerpo para hacer frente al estrés (Wendelaar Bonga, 1997). Tanto en peces como en mamíferos, la microbiota afecta al eje HPA, a la respuesta al estrés y al comportamiento, en particular, a los comportamientos de ansiedad que a su vez podrían afectar a las pautas de alimentación y la homeostasis energética. Por ejemplo, en el pez cebra (*D. rerio*), mejorar la microbiota (por medio de pro y prebióticos) reduce el comportamiento similar a la ansiedad (Davis y col., 2016) y disminuye la respuesta al

estrés mediante la reducción de la expresión de la CRH y los niveles de cortisol (Forsatkar y col., 2017).

Además, el estrés puede cambiar la estructura de la mucosa intestinal e inducir alteraciones, afectando a la absorción de nutrientes y al sistema inmunitario intestinal (o tejido linfoide asociado al intestino, GALT), lo que puede conducir a infecciones causadas por patógenos oportunistas (Sekirov y Finlay, 2009). En los peces, el estrés agudo causado por la manipulación inducen un aumento del desprendimiento del moco y la eliminación de bacterias autóctonas que desempeñan un papel protector contra posibles patógenos (Vatsos, 2017). En general, el estrés resulta en modificaciones de la microbiota intestinal pudiendo alterar la respuesta inmunitaria y aumentar el riesgo de colonización/invasión por patógenos e infección. Sin embargo, diferentes especies de peces pueden hacer frente al estrés de diversas maneras alternativas, de modo que los efectos del estrés en la microbiota intestinal pueden diferir de manera interespecífica (Vatsos, 2017).

1.3.4. Reproducción

La reproducción está estrechamente relacionada con la homeostasis energética ya que es energéticamente muy costosa y sólo se puede lograr con éxito cuando hay suficientes reservas de energía disponibles (Carnevali y col., 2017). Varios estudios han demostrado que la microbiota intestinal puede contribuir al desarrollo de las gónadas y al éxito reproductivo del huésped. Por ejemplo, la administración continua de *Lactobacillus rhamnosus*, desde el nacimiento hasta la maduración sexual, altera la microbiota intestinal y acelera el desarrollo larvario del pez cebra (*D. rerio*) mejorando el crecimiento y la diferenciación sexual (Avella y col., 2012; Carnevali y col., 2013). Las hembras adultas de pez cebra tratadas con *L. rhamnosus* muestran un aumento en el número de folículos vitelogénicos y mayores índices gonadosomáticos (GSI), un mayor número de óvulos ovulados y mayores niveles de expresión de hormonas reproductivas en comparación con el grupo control, aumentando así la probabilidad de éxito reproductivo (Carnevali y col., 2013). Del mismo modo, en especies de peces ornamentales, la suplementación de piensos con probióticos aumenta los GSI, la fecundidad y la producción de alevines de hembras de desove, así como la longitud y el peso de los alevines (Ghosh y col., 2007). Aunque todavía se están investigando los mecanismos que median las acciones de la microbiota intestinal en la reproducción del huésped, es probable que estos mecanismos impliquen la regulación de la alimentación, la absorción de alimentos y la homeostasis energética.

1.4. Factores que afectan a la microbiota

Una gran cantidad de factores exógenos y endógenos pueden afectar el establecimiento y la naturaleza de la composición microbiana en los diferentes tejidos mucosos de los peces incluyendo factores propios del huésped (genética, sexo, peso, edad, inmunidad y motilidad intestinal) (Bolnick y col., 2014; Li y col., 2012; Stephens y col., 2016), factores ambientales (calidad del agua, dieta y administración de medicinas/fármacos) (Dehler y col., 2017; Ringø y col., 2016; Sullam y col., 2012), factores microbianos (capacidad de adherencia, producción de enzimas o capacidad metabólica) (Prakashy col., 2011) y variabilidad entre individuos (Boutin y col., 2014; Fjellheim y col., 2012) (Fig. 4).

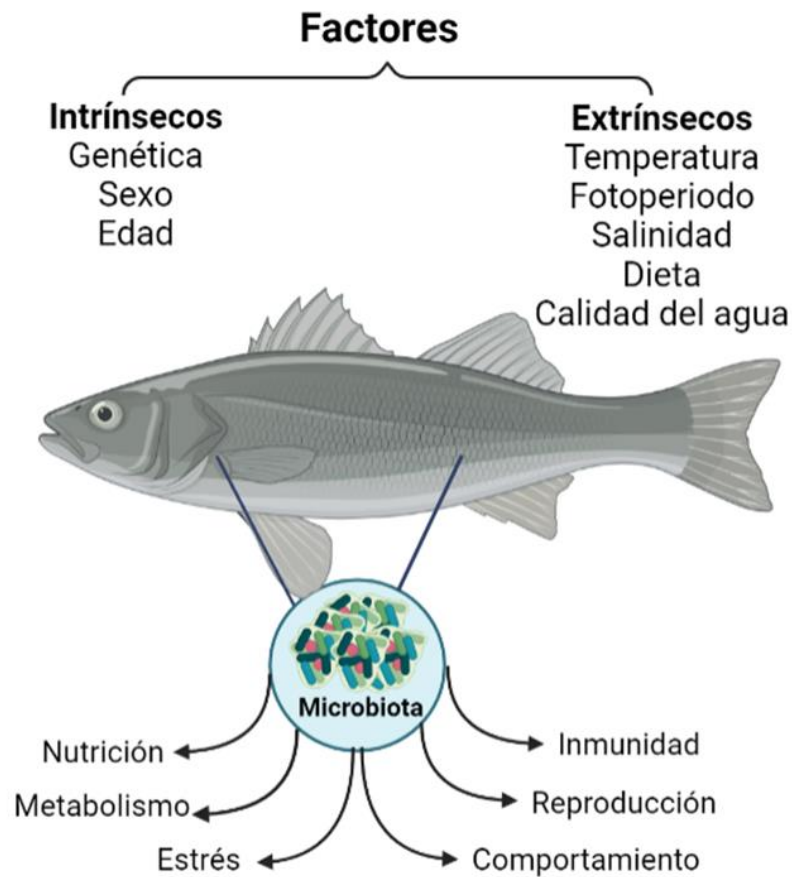


Figura 4. Factores intrínsecos y extrínsecos que pueden modular la microbiota de los peces teleósteos y su impacto en el huésped.

En los sistemas de cultivo, es conocido que una gran variedad de factores influye en la microbiota de los peces. En particular, la química y la calidad del agua pueden tener un impacto en estas comunidades microbianas. Específicamente, la hipoxia, las altas concentraciones de amoníaco, el pH y la salinidad subóptimos perturban la microbiota y pueden ocasionar desequilibrios que representan un riesgo para la salud de los peces (Boutin y col., 2013; Qi y col., 2017; Sylvain y col., 2016; Zhang y col., 2016). Además, los microorganismos que residen en el agua pueden afectar a la microbiota gastrointestinal de los peces (Tanasomwang y Muroga, 1988). Este hallazgo fue confirmado por Navarrete y colaboradores (2009) al informar que la presencia de *Pseudomonas* spp. en el intestino de salmón Atlántico (*S. salar*) se debía a su presencia en el agua circundante.

La temperatura y la salinidad del agua son dos factores principales que afectan a la microbiota de los peces. Hagi y colaboradores (2004) describieron que la composición de las bacterias del ácido láctico (LAB) intestinal varió con las diferentes estaciones en cuatro especies diferentes de peces: carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), carpa común (*Cyprinus carpio*), pez gato americano (*Ictalurus punctatus*) y carpa cruciana (*Carassius cuvieri*). Este hecho reveló que la abundancia de LAB predominante dependía de la temperatura del agua, independientemente de la especie. También se han puesto de manifiesto variaciones estacionales en la microbiota intestinal de salmón del Atlántico (*S. salmar*) (Hovda y col., 2012; Zarkasi y col., 2014) y tilapia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) (Al-Harbi y Uddin, 2004). Parece también ser general el hecho de que el número de bacterias generalmente aumenta con la temperatura del agua (Neuman y col., 2016).

Con respecto a la salinidad, varios estudios han demostrado que la microbiota intestinal de peces de agua dulce y salada es diferente (Ringø y Strøm, 1994), es decir, que la composición de bacterias se correlaciona con la salinidad del agua (Sullam y col., 2012). Además, la microbiota intestinal de los peces de estuarios parece ser más similar a los de agua dulce, mientras que la microbiota intestinal de los peces de hábitats salobres es más parecida a la de peces de agua salada. En particular, Zhang y colaboradores (2016) investigaron la composición de la microbiota de la tilapia del Nilo (especie eurihalina) criada bajo diferentes salinidades. Los resultados mostraron que la abundancia de *Devosia*, *Pseudomonas* y *Cetobacterium* aumentaron en los ambientes de mayor salinidad; asimismo se observó un aumento en la proporción de patógenos oportunistas

(por ejemplo, *Acinetobacter* y *Shewanella*) y una disminución en la abundancia de microbiota comensal o beneficiosa en el intestino cuando los peces fueron sometidos a estrés hipersalino (Zhang y col., 2016).

Uno de los factores más estudiados en la microbiota de peces teleósteos es la dieta. En 1953 ya se estudió que el ayuno tiene gran influencia en las bacterias intestinales de los peces (Margolis, 1953). Actualmente son varios los estudios que han demostrado que la dieta puede influir fuertemente en la microbiota gastrointestinal de los peces (Ringøy col., 2006; Sullam y col., 2012; Uchii y col., 2006; Xia y col., 2014). En particular, Firmicutes domina el intestino de los peces alimentados con aceites de origen vegetal, mientras que Proteobacteria es el filo dominante en los peces que son alimentados con aceite de pescado (Desai y col., 2012). Asimismo, el hábito de alimentación también es un factor importante que influye en diversidad microbiana gastrointestinal y una tendencia creciente en diversidad se observó siguiendo el orden de los carnívoros, omnívoros y herbívoros (Larseny col., 2014; Li y col., 2014; Ward y col., 2009). También se ha estudiado que las bacterias degradantes de celulosa como *Clostridium*, *Citrobacter* y *Leptotrichia* son dominantes en el intestino de los peces herbívoros, mientras que *Cetobacterium* y otras bacterias productoras de proteasa son dominantes en los carnívoros (Liu y col., 2016).

Todos estos resultados ponen de manifiesto que, en la acuicultura, los componentes dietéticos de los piensos tienen un impacto particularmente significativo en la microbiota intestinal de los peces. Entre otras, las diferencias en las fuentes y el contenido de componentes principales (por ejemplo, lípidos y proteínas), vitaminas, minerales y otros compuestos bioactivos (tales como prebióticos, probióticos, simbióticos o inmunoestimulantes) tienen un notable impacto en la microbiota intestinal y están vinculados a diversos estados de salud y rendimiento (Ringøy y col., 2016). En particular, la utilización de plantas como fuentes de proteína alternativa a las harinas de pescado para especies carnívoras produce un impacto significativo en la microbiota intestinal. Más específicamente, se cree que los complejos indigestos y los factores anti-nutricionales son los responsables de impulsar las alteraciones generalizadas de la microbiota intestinal y la regulación positiva de las respuestas inflamatorias, que conducen a patologías significativas en algunos casos (Gajardo y col., 2016).

1.5. Técnicas de estudio

Como numerosos estudios han indicado, las técnicas dependientes del cultivo poseen una sensibilidad dudosa y son capaces de detectar solo una fracción limitada de las comunidades microbianas presentes en las muestras estudiadas (Austin, 2006; Kim y col., 2007; Larsen y col., 2013). Por esta razón, se han desarrollado varios métodos para el análisis microbiano independiente del cultivo en las últimas décadas (Head y col., 1998). Los métodos moleculares proporcionan resultados más rápidos y conocimientos novedosos y de alta resolución sobre la estructura y diversidad de las comunidades microbianas de los peces de agua dulce y salada (Austin, 2006; Kim y col., 2007; Larsen y col., 2013).

Los estudios de las poblaciones microbianas pasaron a finales del siglo pasado por un punto de inflexión debido al desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva. A pesar de estos hallazgos, el costo, las dificultades técnicas y la baja cobertura asociada con la secuenciación de Sanger, considerada como secuenciación de primera generación, han limitado la capacidad de analizar un gran número de muestras. Recientemente, se han introducido enfoques rápidos y de bajo costo para las tecnologías NGS, también llamadas de secuenciación masiva o de segunda generación, para estudiar la composición y el potencial genético de las comunidades microbianas. Esta metodología permite pasar de la secuenciación en serie (clon por clon) a la secuenciación en paralelo de cientos de miles de fragmentos de ADN en una sola reacción.

Estos enfoques se basan en la amplificación mediante PCR del gen ribosomal 16S para Eubacteria y Archaea. Evaluar la diversidad microbiana, identificar especies bacterianas y realizar agrupaciones por comparación de secuencias es posible debido al alto grado de conservación del gen codificante para el 16S rRNA en los dominios Bacteria y Archaea (Woese, 1987). Por otro lado, la asignación taxonómica es posible debido a la presencia de nueve regiones hipervariables (V1-V9) que contienen suficiente diversidad de secuencia para clasificar a los microorganismos (**Fig. 5**). Además, dado que regiones conservadas flanquean estas regiones variables, es posible la amplificación por PCR utilizando cebadores universales.

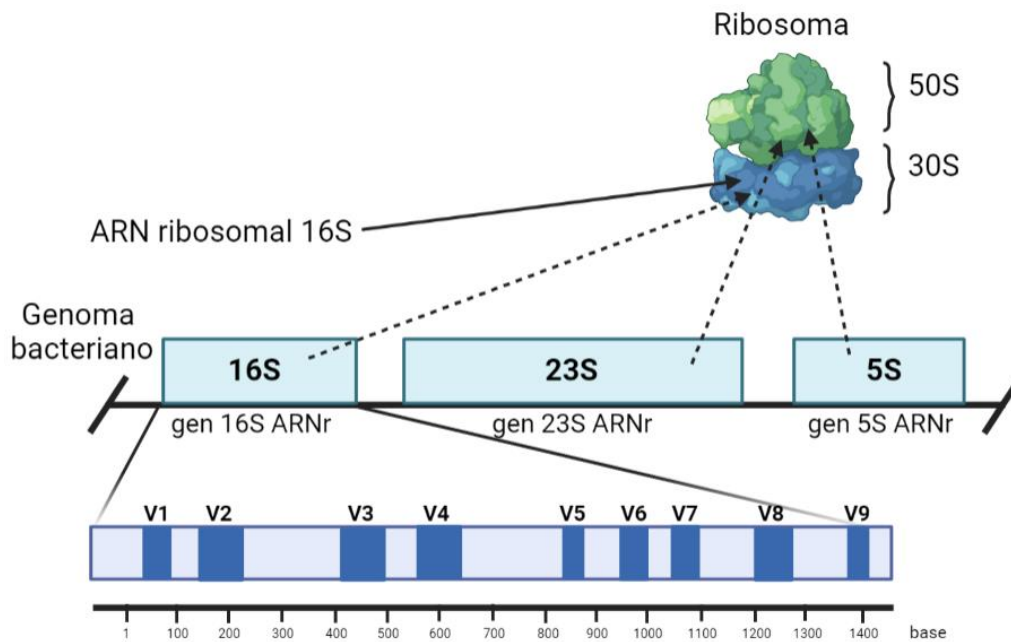


Figura 5. Esquema del complejo ribosómico y del gen ARNr 16S. Los cuadros azul claro y azul oscuro indican regiones conservadas y regiones hipervariables (V1-V9) respectivamente.

Los estudios de microbiota de peces han utilizado con mayor frecuencia las tecnologías 454/Roche *pyrosequencing* (por ejemplo, Roche 454 FLX Titanium y FLX +) e Illumina (por ejemplo, Illumina MiSeq y HiSeq 2000). A diferencia del enfoque de secuenciación de Sanger, estas plataformas NGS proporcionan un mayor número de lecturas en una sola ejecución, lo que permite la adquisición rápida y rentable de datos de secuencia en profundidad y precisos y permite la detección de miembros de la comunidad microbiana dominantes y de baja abundancia (Roeselers y col., 2011; Wong y col., 2013).

1.6. Importancia de la microbiota en la piscicultura

El control de los microorganismos asociados a los sistemas acuícolas (microbiota acuícola) siempre ha sido esencial en la cría de peces en sistemas intensivos. Los microbios pueden servir como una solución a distintos desafíos que existen en la industria acuícola. Sin embargo, la implementación de productos basados en microbiomas está en sus inicios ya que la microbiota de peces acuícolas no se ha caracterizado en el mismo grado que sus homólogos terrestres.

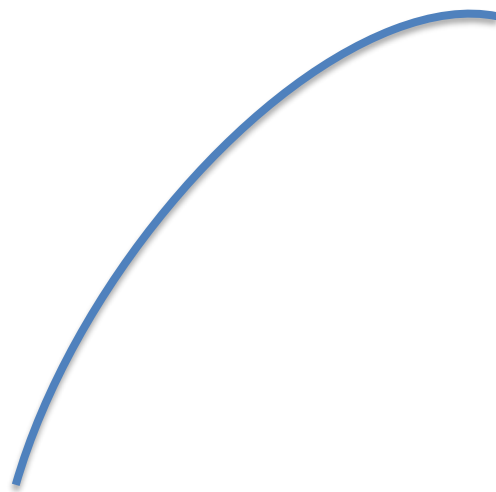
Las prácticas en acuicultura, como la pesca con redes y el traslado de peces (por ejemplo, entre los sistemas de incubación y de cría) y la alta densidad de cría, influyen en la microbiota y por tanto en la productividad y en la salud de los peces (Boutin y col., 2013).

El estrés y los diferentes regímenes de alimentación también son claves en la diversidad microbiana intestinal de los peces (Lin y col., 2018; Mekuchi y col., 2018; Ringø y col., 2016). Por ejemplo, en regímenes variados de alimentación, la inanición condujo a un aumento de Bacteroidetes y una disminución de β -Proteobacteria en la microbiota intestinal de la lubina asiática (*Lates calcarifer*) (Xia y col., 2014), mientras que en el mero de coral leopardo (*Plectropomus leopaardus*) los filos dominantes fueron Proteobacteria en ayuno y Firmicutes en régimen de alimentación (Mekuchi y col., 2018).

También se han observado cambios en la microbiota de la piel debido a la exposición a factores estresantes, como la hipoxia, que conduce a una pérdida de microbiota beneficiosa (por ejemplo, *Methylobacterium*, *Sphingomonas* y *Propionibacterium*) y a un aumento de patógenos oportunistas (por ejemplo, *Aeromonas*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*) en trucha de manantial (*Salvelinus fontinalis*) (Boutin y col., 2013). Además, se observó un aumento en el número total de bacterias cultivables asociadas a la piel en trucha arco iris (*O. mykiss*) después de cinco horas de transporte, lo cual está considerado como estrés agudo (Tacchi y col., 2015).

Todos estos hallazgos ponen de manifiesto la importancia del estudio de la microbiota en peces de cultivo para la industria acuícola, particularmente, en lo que respecta a la modulación de la microbiota para promover la salud y el crecimiento de los peces de cultivo.

Objetivos



El objetivo general de la presente **Tesis Doctoral** es avanzar en el conocimiento de la microbiota asociada a distintas regiones corporales de peces marinos, cultivados en la zona del mediterráneo, utilizando métodos no invasivos, por ser fundamental para identificar tanto situaciones favorables como desfavorables para la salud y el rendimiento de los peces y para tener un mayor información y nuevas perspectivas que nos indiquen cómo poder manipular estas comunidades microbianas con el objetivo de mejorar la salud y el bienestar de los peces y, por extensión, la productividad de las granjas.

Para conseguir el objetivo general nos hemos planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar los cambios en la microbiota del moco de la piel y en el sistema Inmunitario (sistémico y local) durante un episodio de estrés crónico.
2. Examinar las alteraciones en la microbiota del moco de la piel tras una infección bacteriana causada por *Vibrio harveyi*.
3. Establecer si es posible utilizar heces, en lugar de tejido intestinal, para determinar la composición microbiana del tracto gastrointestinal de dorada como método no invasivo.

Capítulo 1:

Modulación de la inmunidad y de la microbiota del moco de la piel de dorada (*Sparus aurata*) durante un episodio de estrés crónico

| | Pág. |
|-------------------------|------|
| 1. Resumen | 30 |
| 2. Resumen gráfico | 31 |
| 3. Introducción | 32 |
| 4. Materiales y métodos | 33 |
| 5. Resultados | 43 |

1. Resumen

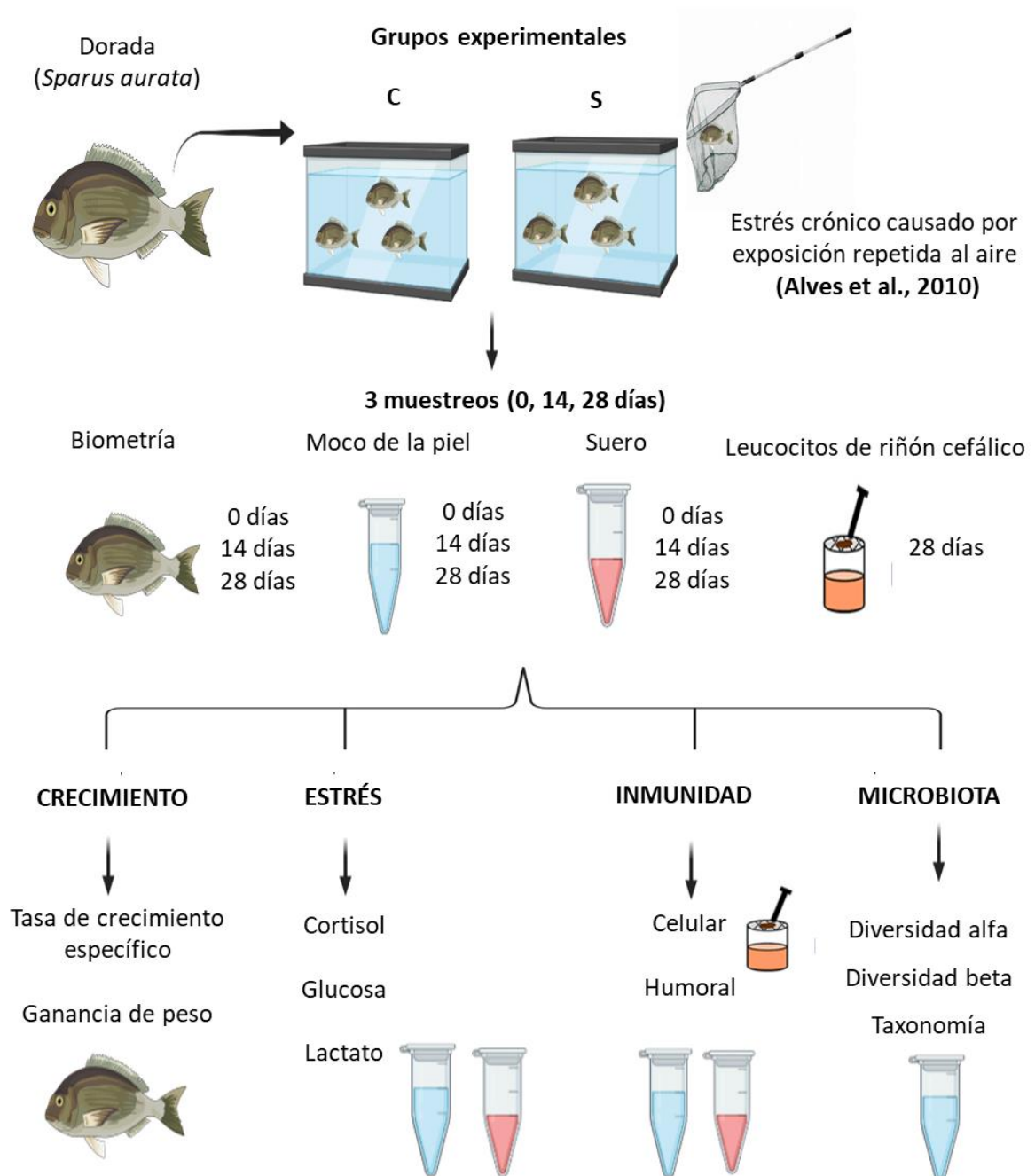
El estrés de los peces es una preocupación importante para la industria de la acuicultura. Muchos factores estresantes procedentes de las prácticas rutinarias pueden predisponer a los peces a un crecimiento y a una salud, en general, comprometidos.

Este capítulo se centra por un lado en el rendimiento del crecimiento y el estado inmunológico de los peces y por otro lado en la caracterización de la microbiota de la mucosa de la piel de la dorada utilizando tecnología NGS durante un episodio de estrés crónico.

Se establecieron dos grupos: grupo control (C) y grupo de estrés crónico (S). Los peces C permanecieron sin perturbar mientras que los peces S se sometieron a 1 min de exposición al aire dos veces por semana durante 4 semanas. Los resultados de este estudio mostraron que el estrés afectó negativamente el rendimiento del crecimiento de los peces. La inmunidad celular y sistémica no se vio afectada mientras que la inmunidad de la piel se estimuló positivamente (IgM total y peroxidasa). La composición microbiana del moco de la piel mostró diferencias significativas, especialmente después de 14 días. Los peces estresados crónicamente mostraron una disminución en la abundancia de los géneros *Acinetobacter*, *NS3a_marine_group* y *Pseudomonas*, mientras que *Pseudoalteromonas* y *Marinagarivorans* aumentaron significativamente.

Como conclusiones de este estudio, el estrés por exposición al aire se asoció con alteraciones negativas en el rendimiento de los peces y, por otro lado, alteraciones en la inmunidad y en la composición microbiana de la mucosa de la piel que pueden haber sido beneficiosas para el huésped mediante la adaptación al estrés.

2. Resumen gráfico



3. Introducción

El estrés y el bienestar de los peces son temas muy relevantes para los acuicultores, ya que el crecimiento, el rendimiento reproductivo y la susceptibilidad a enfermedades están directamente relacionados con ellos (Conte, 2004). Como ya se comentó en la introducción, los peces pueden verse afectados por una gran cantidad de factores (físicos, ambientales y sociales) que pueden resultar estresantes para ellos. Según las características, la intensidad y la duración del factor estresante, puede dar lugar a cambios en los organismos, que van desde una recuperación rápida y total hasta causar grandes desequilibrios e incluso la muerte (Tort, 2011). Las propias prácticas en acuicultura, tales como la manipulación repetitiva y el hacinamiento, pueden convertirse en posibles factores estresantes crónicos que afectan gravemente a la fisiología y al estado de salud de los peces (Arends y col., 1999; Barton, 2002; Mugnier y col., 1998).

En los peces, la respuesta al estrés se puede estudiar a tres niveles. La respuesta primaria implica la activación rápida del sistema nervioso simpático. Esta vía, denominada eje hipotalámico-simpático-cromafín (HPC), actúa liberando inmediatamente catecolaminas (adrenalina, noradrenalina) y cortisol al torrente sanguíneo. La respuesta secundaria incluye efectos hormonales en la sangre y los tejidos, incluidos cambios en el metabolismo, el equilibrio hidromineral y las funciones cardiorrespiratorias e inmunitarias. La respuesta terciaria incluye efectos fisiológicos relacionados con el rendimiento del animal completo, como el crecimiento, la resistencia a las enfermedades, el comportamiento y la supervivencia (Barton, 2002; Iwama, 2007; Wendelaar y col., 2018).

Generalmente, la respuesta al estrés en los peces se evalúa midiendo tanto los niveles de parámetros hormonales, metabólicos, hematológicos e hidrominerales en la sangre como parámetros de crecimiento y de alimentación (Barton, 2002). Sin embargo, otros estudios más recientes han dirigido su atención hacia la medición de parámetros de estrés en las propias mucosas, determinándolos fundamentalmente en el moco, como método no invasivo (Guardiola y col., 2016; Tacchi et al., 2015). La capa de moco cubre las superficies mucosas de peces (intestinal, branquial, de la piel y nasal) y contiene moléculas inmunitarias que interactúan directamente con las poblaciones microbianas comensales en dichas superficies (Salinas, 2015). En situaciones de estrés, se cree que la comunicación cruzada entre el

sistema inmunitario de peces teleósteos y la microbiota presente en la mucosa cambia significativamente convirtiendo a ciertos comensales en oportunistas o patógenos (Kelly y Salinas, 2017). Sin embargo, todavía no se comprende bien cómo responde la microbiota de los peces ante estas perturbaciones.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue caracterizar y analizar la microbiota presente en el moco de la piel de dorada a lo largo de un episodio inducido de estrés crónico, mediante un enfoque metagenómico. Paralelamente, se realizó el estudio del crecimiento y del sistema inmunitario de los mismos peces.

4. Materiales y métodos

4.1. Animales y diseño experimental

Se emplearon 18 ejemplares de dorada obtenidos de una granja local (Murcia, España) con un peso medio de $158,92 \pm 4,75$ g y una longitud de $21,16 \pm 0,38$ cm. Los peces se distribuyeron aleatoriamente en seis tanques de 250 L y se dejaron aclimatar durante 2 semanas antes del experimento. La temperatura del agua (20 ± 2 °C), la salinidad (30 ‰) y el caudal (900 L h^{-1}) fueron comprobados diariamente. Se estableció un fotoperiodo artificial de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Durante el experimento, los peces fueron alimentados dos veces al día (a las 10:00 y 16:00 h) *ad libitum* con una dieta comercial (Skretting, España).

Se establecieron dos grupos: control (C) y estresado crónicamente (S) por triplicado. Los peces del grupo C permanecieron sin ser perturbados mientras que los peces del grupo S se sometieron a estrés por captura con salabre (manipulación) y tras ello fueron expuestos durante 1 minuto al aire, dos veces por semana durante 4 semanas, lo que, según estudios previos, induce estrés crónico a la dorada (Alves y col., 2010; Arends y col., 1999). Se establecieron como tiempos de muestreo t0 (muestreo inicial), t14 (después de 14 días) y t28 (después de 28 días).

4.2. Toma de muestras

Los peces fueron anestesiados con aceite de clavo (Guinama®) ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) antes de realizar la biometría y la toma de muestras. Se tomaron muestras de sangre de la vena caudal con una jeringa de insulina, que se dejó coagular a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 h y se centrifugó (10.000 rpm , 10 min , $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Después de la centrifugación, el sobrenadante (suero) se almacenó a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Las muestras de moco de la piel se recolectaron raspando suavemente la superficie dorso lateral con un recolector de células de plástico, evitando la contaminación con sangre y/o excreciones urinarias, genitales e intestinales (Guardiola y col., 2014). Las muestras de moco se centrifugaron (10.000 rpm , 10 min , $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) y el sobrenadante se almacenó a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Por otro lado, también se tomaron medidas biométricas (peso y longitud).

Al final del experimento (t28), también se tomaron medidas biométricas, así como muestras de sangre y moco de la piel. Además, los peces fueron cuidadosamente diseccionados para obtener leucocitos de riñón cefálico. Para ello, el riñón cefálico se cortó en pequeños fragmentos, se pasó por un filtro celular (nylon de $100 \text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro) y se transfirió a 10 ml de sRPMI [medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)] suplementado con cloruro de sodio al $0,35\%$, 2% (v./v) suero fetal bovino (Sigma-Aldrich), $10 \text{ }\mu\text{l ml}^{-1}$ de heparina (Sigma-Aldrich), 100 UI ml^{-1} de penicilina (Flow) y 100 mg ml^{-1} de estreptomicina (Flow)]. Después, los leucocitos de riñón cefálico fueron lavados dos veces (1.500 rpm , 10 min) con sRPMI (sin heparina) y contados (*Z2 Coulter Particle Counter*) para ajustar las células viables a $1 \times 10^7 \text{ células ml}^{-1}$ usando la prueba de viabilidad del azul tripán.

4.3 Parámetros de crecimiento

El peso corporal y la longitud de cada pez fueron obtenidos antes, durante y al finalizar el experimento. El crecimiento fue estudiado obteniendo la ganancia de peso (WG%) y la tasa de crecimiento específico (SGR%), las cuales fueron calculadas según Silva-Carrillo y colaboradores (2012):

$$\text{WG\%} = [(\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{peso inicial}] \times 100$$

$$\text{SGR\%} = [(\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{número de días}] \times 100$$

4.4. Parámetros de estrés

Los niveles de glucosa, lactato y cortisol se evaluaron en muestras de suero y moco de la piel utilizando kits comerciales (IBL) siguiendo los procedimientos del fabricante adaptados a placas de 96 pocillos. Dichos niveles se expresaron como mg dl⁻¹ en el caso de la glucosa y el lactato y como µg dl⁻¹ en el caso del cortisol.

4.5. Parámetros inmunitarios

4.5.1. Parámetros inmunitarios celulares en leucocitos de riñón cefálico

4.5.1.1. Actividad fagocítica

La fagocitosis de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa S288C) por parte de los leucocitos de riñón cefálico de dorada se estudió mediante citometría de flujo (Rodríguez y col., 2003). Las células de *S. cerevisiae* inactivadas por calor y liofilizadas, fueron marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma), lavadas y ajustadas a 10⁸ células ml⁻¹ en sRPMI. Para realizar el ensayo, se mezclaron 100 µl de 10⁷ leucocitos en sRPMI y 60 µl de *S. cerevisiae* y se centrifugaron (1.500 rpm, 5 min, 22 °C), antes de volver a ser re-suspendidos e incubados a 22 °C durante 30 min. Posteriormente, las muestras se colocaron en hielo para detener la fagocitosis y se les añadieron 400 µl de tampón fosfato salino (PBS) frío. La fluorescencia de las levaduras extracelulares se apagó mediante la adición de 40 µl de azul tripano frío (0,5% en PBS). En cada ensayo de fagocitosis se incluyeron muestras estándar de leucocitos y levadura. Todas las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo (Becton Dickinson) con un láser de iones de argón ajustado a 488 nm. Los análisis fueron realizados en 3.000 células que fueron adquiridas a una tasa de 300 células s⁻¹. Los datos se recogieron en forma de dos parámetros, dispersión lateral (granularidad) (SSC) y dispersión frontal (tamaño) (FSC), y se realizaron diagramas de puntos o histogramas de fluorescencia verde (FL1) en un sistema computarizado. Los histogramas de fluorescencia representan la fluorescencia relativa en una escala logarítmica. El citómetro se configuró para analizar las células fagocíticas, mostrando los valores más altos de SSC y FSC. La habilidad fagocítica se definió como el porcentaje de células con una o más levaduras ingeridas (células fluorescentes verdes-FITC) dentro de la población de células fagocíticas, mientras que la

capacidad fagocítica fue la intensidad media de fluorescencia. Se realizó un estudio cuantitativo de los resultados utilizando la opción estadística del *Lysis Software Package* (Becton Dickinson).

4.5.1.2. Explosión respiratoria

La explosión respiratoria de los leucocitos de riñón cefálico de dorada se estudió mediante quimioluminiscencia (Bayne y Levy, 1991). Brevemente, se añadieron 100 μl de 10^7 leucocitos en sRPMI en placas de fondo plano de 96 pocillos por triplicado. A continuación, se añadieron 100 μl de HBSS (solución salina equilibrada de Hank, Gibco) que contenían 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de acetato de miristato de forbol (PMA, Sigma) y 10^{-4} M de luminol (Sigma) a cada pocillo. Las placas se agitaron y leyeron inmediatamente en un lector de placas. Se analizó la cinética de las reacciones cada 2 min durante 1 h, y se calculó la pendiente máxima de cada curva. Se calcularon los blancos de luminiscencia usando soluciones reaccionantes que contenían leucocitos con luminol sin PMA. Los resultados se expresaron como pendiente min^{-1} .

4.5.1.3. Actividad peroxidasa

La actividad peroxidasa en leucocitos de riñón cefálico se midió siguiendo el protocolo de Quade y Roth, (1997). Se añadieron 5 μl de 10^7 leucocitos en sRPMI en una placa de fondo plano de 96 pocillos por triplicado y se lisaron con 50 μl de bromuro de cetiltrimetilamonio 0,002%, (CTAB Sigma). Después, se agitaron durante 10 min a 60 rpm en oscuridad y se añadieron 100 μl de clorhidrato de 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina 20 mM (TMB, Sigma) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 5 mM a cada pocillo. La reacción de cambio de color se detuvo después de 2 min añadiendo 50 μl de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2 M y se leyó la densidad óptica a 450 nm en un lector de placas. Se utilizaron muestras estándar sin leucocitos como blanco. Los resultados se expresaron en unidades 10^7 leucocitos.

4.5.2. Parámetros inmunitarios humorales

4.5.2.1. Proteínas totales

La concentración total de proteínas en muestras de suero y moco de la piel se determinó utilizando el método descrito por Ross y colaboradores (2000). Diluciones seriadas de albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) fueron utilizadas como estándar. Las placas se leyeron a 595 nm en un lector de placas (SPECTRO^{stamano}, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania) y la concentración de proteína total presente en cada muestra se expresó como mg ml⁻¹.

4.5.2.2. Niveles totales de inmunoglobulinas

La concentración total de inmunoglobulinas (Igs) en muestras de suero y moco de la piel se determinó utilizando el reactivo Bradford (Bradford, 1976). Para empezar, 50 µl y 10 µl de las muestras se mezclaron con 50 µl y 10 µl de polietilenglicol (PEG) (12%) respectivamente y fueron incubadas durante 2 h a temperatura ambiente (RT). Como estándar, los mismos volúmenes de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) se utilizaron en diluciones seriadas. Después de la incubación, las muestras fueron centrifugadas (10.000 rpm, 10 min, RT) y 5 µl del sobrenadante fueron recogidos y pipeteados en una placa de fondo plano de 96 pocillos junto con 250 µl de reactivo Bradford (Sigma-Aldrich). Después de incubar las placas (10 min, RT, en oscuridad), la absorbancia se leyó a 595 nm en un lector de placas (SPECTRO^{stamano}, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Las Igs totales se calcularon restando el valor obtenido a los niveles totales de proteínas obtenidos previamente y se expresaron como mg ml⁻¹.

4.5.2.3. Niveles totales de inmunoglobulina M

Los niveles de IgM en suero y moco de la piel se analizaron mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Cuesta y col., 2004). Para ello, se colocaron 100 µl por pocillo de suero diluido 1/500 o moco de la piel diluido 100/500 en tampón carbonato-bicarbonato 50 mM (NaHCO₃ 35 mM y Na₂CO₃ 15 mM, pH 9.6) en placas de fondo plano de 96 pocillos por triplicado. Las proteínas se recubrieron mediante incubación durante la noche a 4 °C. Posteriormente, las placas se enjuagaron tres veces con PBS-T (PBS 0,1 M con Tween 20 al 0.05%, pH 7.3) y se bloquearon durante 2 h a RT con tampón de

bloqueo que contenía BSA al 3% (Sigma) diluida en PBS-T, seguido de tres lavados con PBS-T. A continuación, las placas se incubaron durante 1 h con 100 μ l por pocillo de anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgM de dorada (Aquatic Diagnostics Ltd., 1/100 en tampón de bloqueo). Después, las placas se lavaron tres veces con PBS-T y se incubaron durante 1 h con 100 μ l por pocillo de anticuerpo secundario anti-IgG-HRP de ratón (1/1000 en tampón de bloqueo, Sigma). Después de un lavado exhaustivo con PBS-T, las placas se revelaron usando 100 μ l de una solución 0,42 mM de TMB, preparada en un tampón 100 mM de ácido cítrico/acetato de sodio (pH 5,4) que contenía 0,01% de H₂O₂. Se dejó que la reacción prosiguiera durante 10 min y se detuvo mediante la adición de 50 ml de H₂SO₄ 2M y las placas se leyeron a 450 nm en un lector de placas (SPECTRO^{starnano}, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Como control positivo se utilizaron muestras de suero y moco de la piel como controles negativos muestras sin suero o moco de la piel o sin anticuerpo primario, cuyos valores de densidad óptica se restaron para cada valor de muestra. Las IgM totales presentes en cada muestra se expresaron como unidades ml⁻¹.

4.5.2.4. Actividad lisozima

La actividad lisozima en suero y moco de la piel se midió de acuerdo con el método turbidimétrico descrito por Parry y colaboradores (1965) con ligeras modificaciones. Brevemente, se colocaron 20 μ l de suero o moco de la piel diluidos 1:10 con tampón fosfato monosódico-fosfato de disodio (NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 0,04 M, pH 6,2) en una placa de 96 pocillos de fondo plano por triplicado. A continuación, se añadieron a cada pocillo 200 μ l de *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado en el mismo tampón (0,3 mg ml⁻¹, Sigma-Aldrich) como sustrato de lisozima. La reducción de la absorbancia a 450 nm se midió durante 15 min a intervalos de 3 min a RT en un lector de placas (SPECTRO^{starnano}, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Una unidad de actividad de lisozima se definió como una reducción de la absorbancia de 0,001 min⁻¹. Las unidades de lisozima presentes en el suero y en moco de la piel se obtuvieron a partir de una curva estándar elaborada con lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL, Sigma-Aldrich). Los resultados se expresaron como unidades mg proteína⁻¹.

4.5.2.5. Actividad peroxidasa

La actividad peroxidasa en suero y moco de la piel se midió de acuerdo con [Quade y Roth \(1997\)](#). Para ello, se diluyeron 10 μ l de suero o moco de la piel con 40 μ l de tampón de Hank (HBSS) sin Ca^{+2} o Mg^{+2} en placas de 96 pocillos de fondo plano por triplicado. Como sustratos, se añadieron 100 μ l de TMB 20 mM y 5 μ l de H_2O_2 . La reacción se detuvo tras un cambio de color después de 2 min añadiendo 50 μ l de H_2SO_4 2 M y se leyó la densidad óptica (DO) a 450 nm en un lector de placas (SPECTRO^{stamano}, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Se utilizaron muestras estándar sin suero o moco de la piel como blancos. La actividad peroxidasa se expresó como unidades ml^{-1} .

4.5.2.6. Actividad bactericida

En los ensayos bactericidas se utilizaron dos bacterias comúnmente patógenas para la dorada (*V. harveyi* y *Vibrio anguillarum*). Ambas cepas bacterianas se cultivaron a partir de 1 ml de cultivo madre que se había congelado previamente a -80 °C. Las bacterias se cultivaron durante 48 h a 25 °C en agar tripticasa de soja (TSA, Difco Laboratories), y luego se inocularon en caldo de soja tripticaseína (TSB, Difco Laboratories), ambos suplementados con NaCl a una concentración final del 1%. Las bacterias en medio TSB se cultivaron a la misma temperatura, con agitación continua (100 rpm) durante 24 h. Las bacterias que crecieron exponencialmente, se resuspendieron en PBS estéril y se ajustaron a 10^8 unidades formadoras de colonias (CFU) ml^{-1} . La actividad bactericida de muestras de moco de la piel se determinó siguiendo el método de reducción de la sal amarilla de tetrazolio soluble (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) (MTT, Sigma-Aldrich) y la formación de formazano azul insoluble por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial ([Stevens y col., 1991](#)). Para ello se añadieron 20 μ l de moco de la piel en placas de 96 pocillos de fondo plano por triplicado. Como control positivo de crecimiento bacteriano se añadió PBS a algunos pocillos en lugar de las muestras, Se inocularon 20 μ L de la bacteria a ensayar y las placas se incubaron durante 5 h a 25 °C. Después, se agregaron 25 μ L de MTT (1 mg ml^{-1}) disuelto en PBS a cada pocillo y las placas se incubaron durante 10 min a 25°C para permitir la formación de formazano. A continuación, las placas se centrifugaron (2.000 rpm, 10 min) y los precipitados de formazano se disolvieron en 200 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) y se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos de fondo plano. La absorbancia del formazano disuelto se midió a 570 nm en un lector de placas

(SPECTRO^{starmano}, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). La actividad bactericida se expresó como porcentaje de bacterias no viables, calculado como la diferencia entre la absorbancia de las bacterias supervivientes en comparación con la absorbancia de las bacterias de los controles positivos (100%).

4.6. Análisis de la microbiota

4.6.1. Preparación de secuenciación y generación de bibliotecas

El ADN genómico total de las muestras de moco de la piel se extrajo según [Martínez y colaboradores \(1998\)](#) con modificaciones menores ([Tapia-Paniagua y col., 2010](#)). La integridad y pureza del ADN se monitorizó en geles de agarosa al 1%. La concentración se determinó mediante el uso de un fluorímetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Alemania). La amplificación del gen 16S ADNr (región V3-V4) se llevó a cabo utilizando los cebadores 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') y 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') ([Caporaso y col., 2011](#)). Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo con Phusion® *High-Fidelity PCR Master Mix* (New England Biolabs). Los amplicones se purificaron con *Qiagen Gel Extraction Kit* (Qiagen, Alemania), se cuantificaron a través de *Qubit* y se mezclaron en proporciones de densidad iguales. Las bibliotecas generadas con NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit para Illumina, fueron secuenciadas en la plataforma Illumina HiSeq (2 x 250 pb) (Novogene, Cambridge, Reino Unido).

4.6.2. Procesamiento de datos de secuenciación

Las lecturas de extremo pareado se asignaron a las muestras en función de sus códigos de barras únicos, se truncaron cortando las secuencias de código de barras y cebador y se fusionaron mediante FLASH (V1.2.7) ([Bokulich y col., 2013](#)). Luego, las lecturas ensambladas se filtraron por calidad, con un promedio de puntuación de calidad Phred de ≥ 20 , de acuerdo con el proceso de control de calidad QIIME (V1.7.0) ([Edgar y col., 2011](#)). UCHIME se utilizó para detectar y eliminar secuencias quiméricas ([Haas y col., 2011](#)).

4.6.3. Agrupación de OTUS y asignación taxonómica

Las secuencias representativas no quiméricas restantes se analizaron con el software UPARSE (V7.0.1001) y se asignaron a unidades taxonómicas operativas con un límite de similitud del 97%. La anotación en cada rango taxonómico se realizó contra la base de datos SILVA (versión 138) y con el software Mothur (umbral de confianza 0.8-1). Después de generar el perfil taxonómico de las muestras, la información de abundancia de OTU se normalizó utilizando las curvas de rarefacción. Las curvas de rarefacción se obtuvieron trazando el número de OTU observadas contra el número de secuencias y el coeficiente de cobertura *Good* calculado para determinar el nivel de profundidad de secuenciación. Todos estos cálculos se realizaron con QIIME (V. 1.7.0) y se visualizaron con el software R (V. 2.15.3).

4.6.4. Diversidad alfa y beta

La diversidad alfa se estimó en base a los índices chao1, Shannon e inverso de Simpson. La diversidad beta se analizó para evaluar las diferencias entre los grupos experimentales. El análisis de coordenadas principales (PCoA) calculado con índice de Bray Curtis, se realizó mediante el uso del software PAST - *PA*laeontological *S*Tatistics (V. 4.03).

4.7. Análisis estadístico

Los resultados relacionados con el crecimiento, el estrés y los parámetros inmunitarios se expresaron como medias \pm error estándar de la media (SEM) (n=9). La normalidad de las variables fue confirmada por la prueba de Shapiro-Wilk mientras que la homogeneidad de la varianza fue confirmada por la prueba de Levene Bartlett. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA mixto de Tukey (apareado) para determinar las diferencias significativas entre los grupos experimentales y a lo largo del tiempo con una prueba post-hoc de Tukey. Además, se determinó la interacción entre los grupos experimentales y el tiempo. El nivel de significancia fue del 95% en todos los casos ($p < 0,05$). Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 8 RStudio© (v.4.0.3). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Después, las diferencias estadísticas entre los dos grupos en cada momento experimental se evaluaron mediante la prueba T de student de una muestra (no apareado).

Las diferencias significativas en los índices de diversidad alfa entre los grupos se determinaron con la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney realizada con el software R. La prueba de Anosim se calculó utilizando el programa PAST - *PA*laeontological *S*Tatistic (V.4.03) para evaluar las variaciones entre los grupos experimentales. Además, se realizó la prueba T de student para determinar especies con variación significativa entre grupos en los diferentes rangos taxonómicos. El nivel de significancia fue del 95% en todos los casos ($p < 0,05$).

5. Resultados

Los resultados del análisis mixto del conjunto de datos se muestran en la siguiente tabla (**Tabla 1**).

Tabla 1. Resumen de los resultados del análisis estadístico (ANOVA mixto) de los datos (crecimiento, parámetros de estrés e inmunitarios) obtenidos en este estudio. Se muestran los datos de valor-F y los grados de libertad. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (*p valor < 0,05, ** p valor < 0,01, *** p valor < 0,001).

| ANOVA mixto | | | | | |
|-------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------------|---------------------|
| Parámetros | | F _g (DFN,DFD) | F _t (DFN,DFD) | F _{g+t} (DFN,DFD) | |
| Crecimiento | Peso | 0.352 (1,16) | 100.869 (2,32) *** | 7.794 (2,32) ** | |
| | Longitud | 0.0055 (1,16) | 27.966 (2,32) *** | 1.224 (2,32) | |
| Estrés | Suero | Cortisol | 0.044 (1,8) | 2.304 (2,16) | 0.910 (2,16) |
| | | Glucosa | 0.115 (1,16) | 11.878 (2,32) *** | 1.166 (2,32) |
| | | Lactato | 1.368 (1,8.498) | 8.599 (2,9.747) ** | 5.954 (2,9.747) * |
| | Moco de la piel | Cortisol | 1.519 (1,10) | 17.065 (2,20) *** | 3.062 (2,20) |
| | | Glucosa | 9.658 (1, 6.336) | 6.456 (2, 6.317) * | 3.229 (2,6.317) |
| | | Lactato | 0.897 (1,13) | 0.865 (2,26) | 0.838 (2,26) |
| Inmunitario | Suero | Igs totales | 0.354 (1,11) | 15.879 (2,22) *** | 0.282 (2,22) |
| | | IgM | 0.255 (1,15) | 9.058 (2,30) *** | 0,804 |
| | | Proteínas | 0.941 (1,14) | 2.925 * 10 ⁻¹¹ (2,28) *** | 0.627 (2,28) |
| | | Peroxidasa | 0.005 (1,15) | 6.677 (2,30) ** | 0,501 |
| | Moco de la piel | Igs totales | 54.239 (1,16) *** | 18.812 (2,32) *** | 0.160 (2,32) |
| | | IgM | 48.863 (1,15) *** | 6.738 (2,30) | 1.896 (2,30) |
| | | Proteínas | 38.674 (1,15) *** | 19.756 (2,30) *** | 3.241 (2,30) |
| | | Peroxidasa | 7.834 (1,10.983) * | 15.203 (2,6.429) ** | 11.609 (2,6.429) ** |
| | | Lisozima | 3.952 (1,16) | 2.310 (2,32) | 1,133 (2,32) |
| | | Proteasa | 0.522 (1,15) | 1.833 (2,30) | 0.343 (2,30) |
| | | Bactericida | <i>V. anguillarum</i> | 1.406 (1,16) | 2.287 (2,32) |
| | <i>V. harveyi</i> | | 8.891 (1, 10.749) | 2.772 (2, 8.938) | 0.928 (2, 8.938) |

5.1. Parámetros de crecimiento y supervivencia

El análisis mixto no mostró diferencias significativas en el peso o la longitud de los peces pertenecientes a los dos grupos experimentales. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en peso y longitud a lo largo del tiempo. En particular, se observó un aumento del peso y la longitud a lo largo del tiempo. Además, se detectó una interacción del tiempo y los grupos experimentales en el peso de los especímenes. Los parámetros del crecimiento de los peces sometidos o no a estrés crónico se presenta en la **Tabla 2**. Con respecto a las diferencias significativas en los diferentes tiempos experimentales entre los grupos C y S hubo un deterioro significativo tanto en la tasa de crecimiento específico como en el porcentaje de ganancia de peso de los peces que sufrieron estrés crónico con respecto a los peces del grupo control, especialmente durante las dos últimas semanas del experimento (t14 - t28). No se registró mortalidad de peces durante todo el experimento.

Tabla 2. Tasa de crecimiento específico (SGR) y porcentaje de ganancia de peso (%WG) obtenidos de las biometrías de doradas (*Sparus aurata*) de los grupos experimentales: control (C) y crónicamente estresado (S). Los resultados se han expresado como medias \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas.

| Grupo experimental | SGR ₀₋₁₄ | SGR ₁₄₋₂₈ | SGR ₀₋₂₈ | WG ₀₋₁₄ | WG ₁₄₋₂₈ | WG ₀₋₂₈ |
|--------------------|---------------------|----------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| C | 0,38 \pm 0,26 | 0,78 \pm 0,09 | 1,17 \pm 0,15 | 5,68 \pm 2,32 | 11,67 \pm 1,46 | 17,93 \pm 2,60 |
| S | 0,15 \pm 0,05 | 0,39 \pm 0,08* | 0,65 \pm 0,10* | 5,66 \pm 1,19 | 8,91 \pm 2,57* | 9,61 \pm 1,54* |

5.2. Parámetros de estrés

Con respecto a los parámetros de estrés, se observaron diferencias significativas en el lactato y la glucosa séricos. En general, se observó un descenso en las primeras dos semanas y un posterior aumento en las dos últimas semanas de experimento. Además, se observó una interacción del grupo experimental y el tiempo para el lactato sérico. Con respecto a las diferencias significativas en los diferentes tiempos experimentales entre grupos, no se observaron diferencias significativas en los niveles de cortisol, glucosa o lactato en muestras de suero de dorada durante el episodio de estrés crónico (**Fig. 6**).

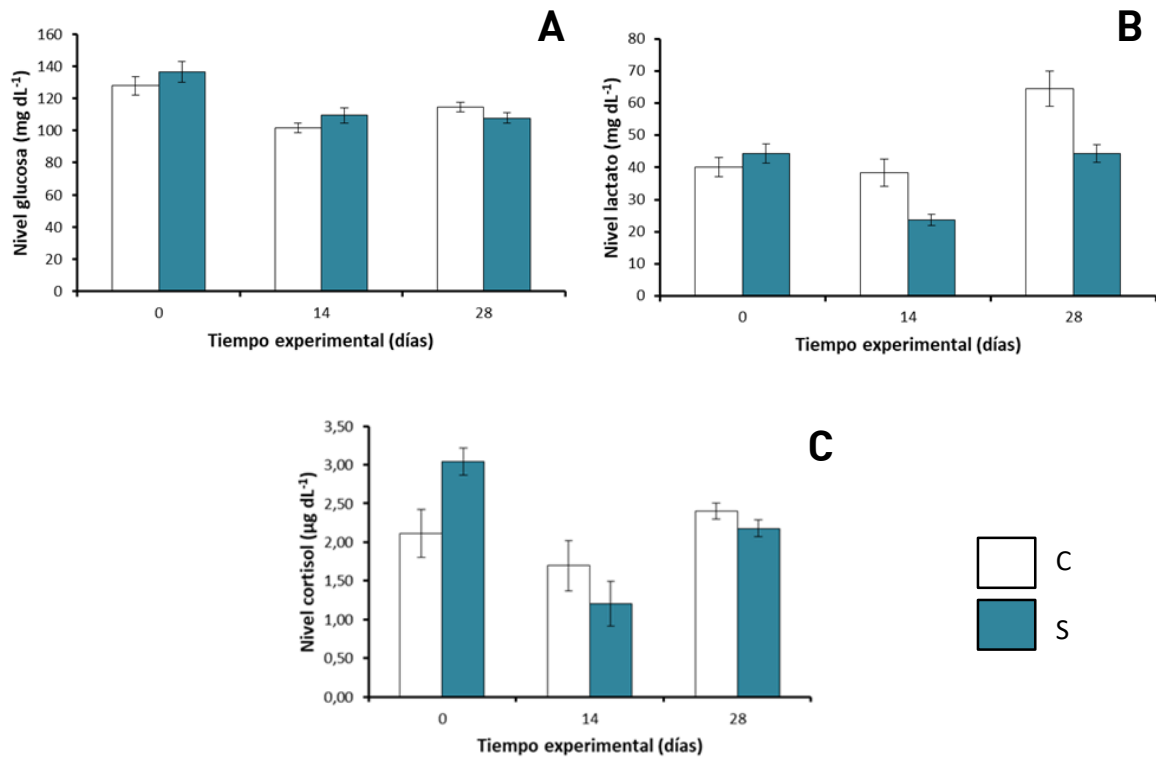


Figura 6. Niveles totales de glucosa (A), lactato (B) y cortisol (C) en suero de dorada (*Sparus aurata*) de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S). Los resultados se han expresado como medias \pm SEM (n=9).

Con respecto a los parámetros de estrés en el moco de la piel, se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo en los niveles de cortisol y de glucosa. En concreto, se detectó un descenso en las primeras dos semanas y un posterior aumento en las dos últimas semanas de experimento. Al igual que en suero, tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de cortisol, glucosa o lactato en muestras de moco de la piel de dorada en los diferentes tiempos experimentales entre grupos (**Fig. 7**).

Capítulo 1: Modulación de la inmunidad y de la microbiota del moco de la piel de dorada (*Sparus aurata*) durante un episodio de estrés crónico

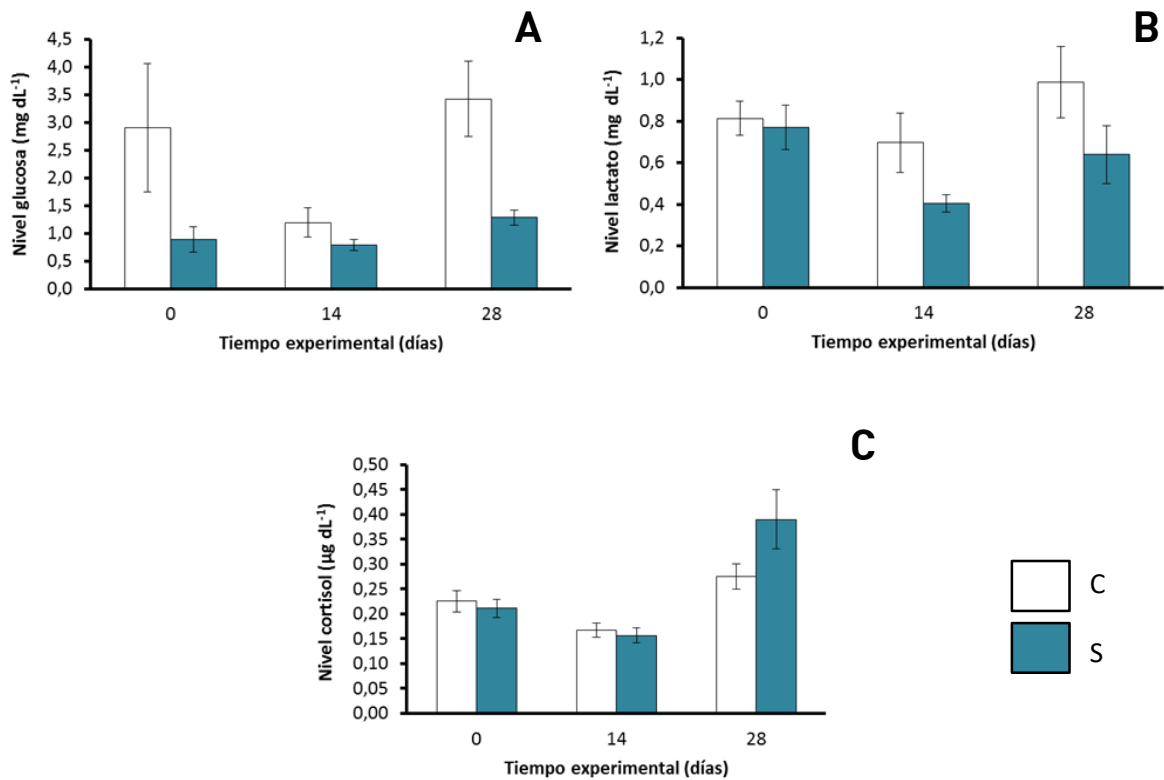


Figura 7. Niveles totales de glucosa (A), lactato (B) y cortisol (C) en moco de la piel de dorada (*Sparus aurata*) de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S). Los resultados se han expresado como medias \pm SEM (n=9).

5.3. Parámetros inmunitarios

En cuanto a las respuestas inmunitarias celulares en los leucocitos de riñón cefálico de dorada evaluadas al final del experimento (**Tabla 3**), tampoco se observaron diferencias significativas en ninguna de las actividades estudiadas (fagocitosis, explosión respiratoria y peroxidasa).

Tabla 3. Actividades inmunitarias celulares en leucocitos aislados a partir del riñón cefálico de dorada (*Sparus aurata*) de los grupos experimentales: control (C) y crónicamente estresado (S). Capacidad y habilidad fagocítica, explosión respiratoria y actividad peroxidasa. Los resultados se han expresado como medias \pm SEM (n=9).

| Grupo experimental | Capacidad fagocítica (u.a) | Habilidad fagocítica (%) | Explosión respiratoria ¹ | Actividad peroxidasa leucocitaria ² |
|--------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--|
| C | 723,19 \pm 44,31 | 56,48 \pm 1,92 | 605,21 \pm 129,51 | 0,08 \pm 0,0068 |
| S | 799,69 \pm 66,49 | 61,91 \pm 1,52 | 428,05 \pm 32,97 | 0,07 \pm 0,0065 |

¹ pendiente min⁻¹

² unidades 10⁷ leucocitos

En relación a los parámetros inmunitarios humorales en el suero de dorada, tanto en niveles de Igs, proteínas e IgM como en las actividades lisozima y peroxidasa, no se encontraron diferencias con respecto al grupo, pero si con respecto al tiempo. Por último, no se detectaron interacciones entre los grupos experimentales y el tiempo. En particular, se observó un incremento en los niveles de Igs, proteínas totales e IgM a lo largo del tiempo. Con respecto a la actividad peroxidasa, se detectó una disminución durante las dos primeras semanas de experimento y un posterior aumento durante las dos semanas posteriores.

Por lo que respecta a las diferencias significativas en los diferentes tiempos experimentales entre grupos, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros y actividades estudiadas (**Tabla 4**).

Tabla 4. Actividades y parámetros inmunitarios humorales en suero de dorada (*Sparus aurata*) de los grupos experimentales: control (C) y crónicamente estresado (S). Proteínas totales, inmunoglobulinas totales, inmunoglobulina M, actividad peroxidasa y actividad lisozima. Los valores se expresan como media \pm SEM (n=9).

| Tiempo experimental* | Proteínas totales (mg ml ⁻¹) | |
|----------------------|--|------------------|
| | C | S |
| T0 | 10,32 \pm 0,96 | 9,81 \pm 0,80 |
| T14 | 14,68 \pm 0,99 | 13,65 \pm 0,66 |
| T28 | 18,05 \pm 1,07 | 18,74 \pm 0,82 |

| Tiempo experimental* | Igs totales (mg ml ⁻¹) | | IgM (mg ml ⁻¹) | |
|----------------------|------------------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| | C | S | C | S |
| T0 | 4,39 \pm 0,55 | 3,85 \pm 0,71 | 0,12 \pm 0,02 | 0,12 \pm 0,01 |
| T14 | 6,01 \pm 0,67 | 5,22 \pm 0,86 | 0,17 \pm 0,02 | 0,15 \pm 0,01 |
| T28 | 8,55 \pm 0,97 | 9,27 \pm 0,79 | 0,19 \pm 0,01 | 0,17 \pm 0,02 |

| Tiempo experimental ¹ | Lisozima (μ g ml ⁻¹) ² | | Peroxidasa (U ml ⁻¹) | |
|----------------------------------|--|-----------------|----------------------------------|-------------------|
| | C | S | C | S |
| T0 | n.d. | n.d. | 19,73 \pm 6,09 | 24,75 \pm 10,16 |
| T14 | 1,16 \pm 0,49 | 0,78 \pm 0,45 | 12,26 \pm 2,17 | 13,91 \pm 3,11 |
| T28 | 0,67 \pm 0,27 | 0,72 \pm 0,26 | 36,58 \pm 2,39 | 29,6 \pm 4,91 |

¹ Días

² μ g ml⁻¹ de actividad lisozima equivalente de clara de huevo

n.d. = No detectado

En cuanto a los parámetros inmunitarios humorales en el moco de la piel de dorada, se encontraron diferencias significativas respecto al grupo en el nivel de Igs, proteínas e IgM, siendo el nivel de Igs y proteínas totales significativamente mayor en el grupo control en comparación al grupo crónicamente estresado. Por el contrario, el nivel de IgM fue significativamente mayor en el grupo crónicamente estresado con respecto al grupo control. Además, se observaron diferencias significativas con respecto al tiempo en los niveles totales de Igs, proteínas, IgM y en la actividad peroxidasa. En particular, los niveles totales de inmunoglobulinas y proteínas disminuyeron en las primeras dos semanas de experimento mientras que aumentaron durante las dos siguientes. En cuanto a los niveles de IgM y a la actividad peroxidasa, aumentaron significativamente en las dos primeras semanas de experimento y disminuyeron durante las dos últimas semanas. Por último, se encontraron interacciones entre los grupos experimentales y el tiempo en la actividad peroxidasa del moco de la piel. No se encontraron diferencias respecto al grupo, al tiempo y tampoco se encontró interacción significativa en la actividad lisozima, proteasa y bactericida en el moco de la piel (*V. anguillarum* y *V. harveyi*). También se detectaron diferencias significativas entre los grupos C y S en los diferentes tiempos experimentales. En particular, los niveles de proteínas totales e Igs en moco de los peces estresados fueron significativamente menores con respecto a los valores detectados en moco de los peces C en todos los tiempos experimentales. Curiosamente, con respecto a los niveles totales de IgM en moco, los peces S tuvieron niveles significativamente más altos que los peces control en los tres tiempos experimentales. Además, la actividad peroxidasa presente en el moco de la piel fue significativamente mayor en los peces estresados a los 14 días de experimento, comparando con los valores del grupo control (**Fig. 8**).

Por último, no se detectaron diferencias significativas en la actividad lisozima, proteasa o en las actividades bactericidas en moco de la piel en ninguno de los tiempos experimentales entre los grupos C y S (**Fig. 9**).

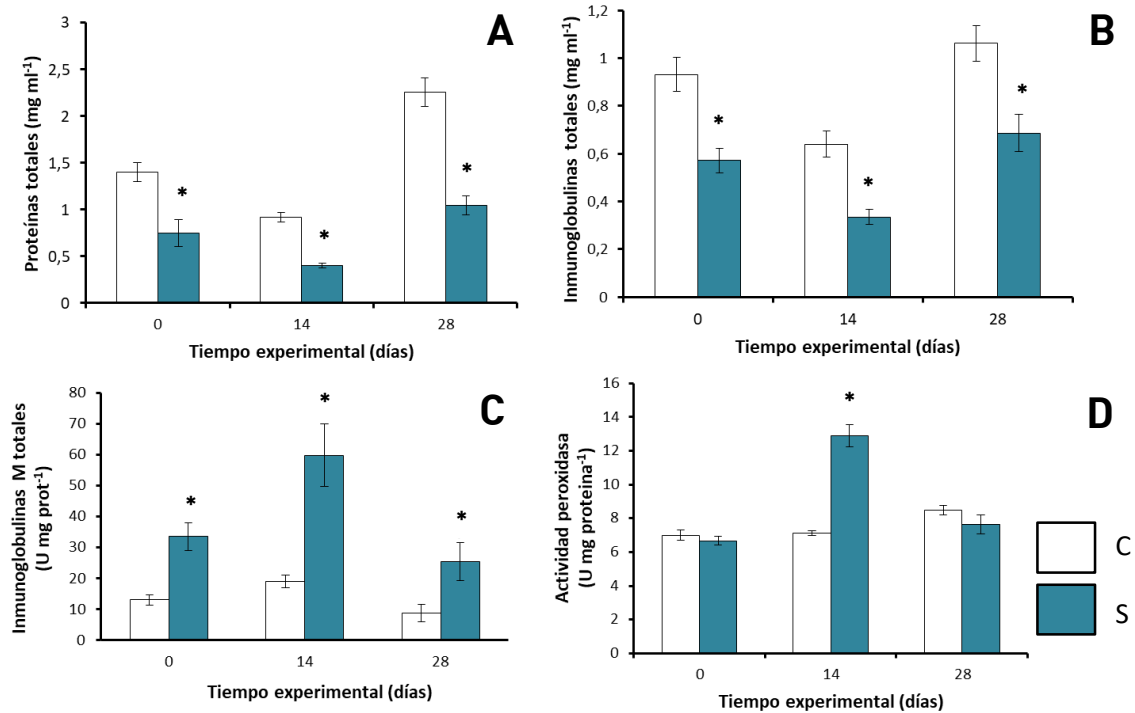


Figura 8. Parámetros inmunitarios en el moco de la piel de ejemplares de dorada (*Sparus aurata*) de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S). Proteínas totales (A), inmunoglobulinas totales (B), niveles de IgM (C) y actividad peroxidasa (D). Los valores se expresan como media \pm SEM (n=9). Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

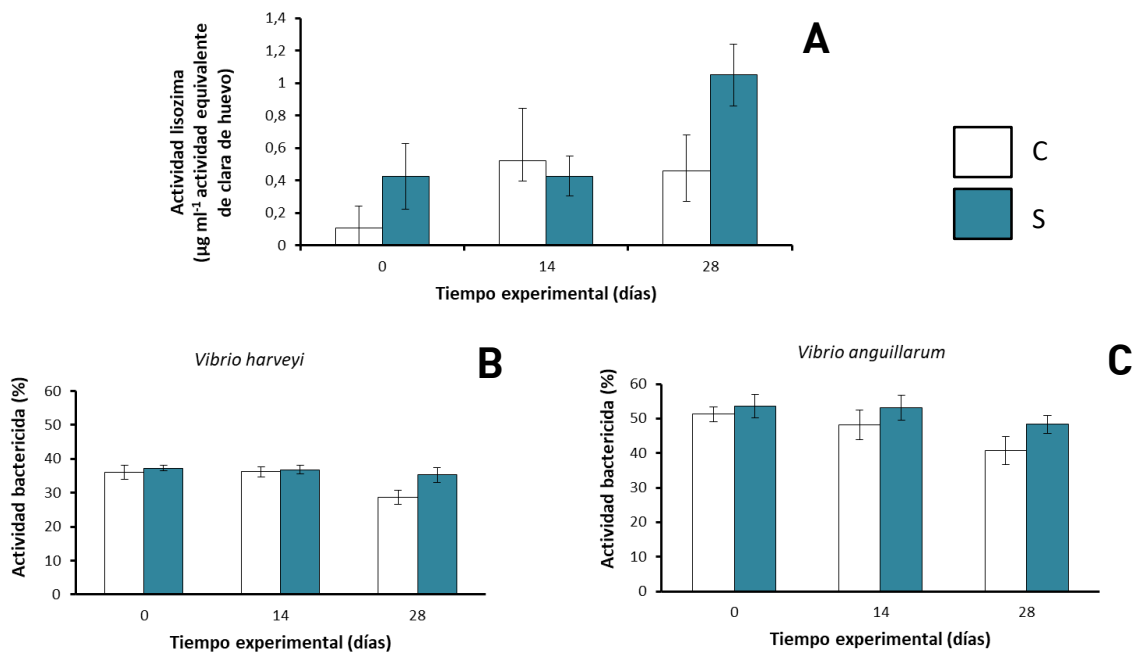


Figura 9. Parámetros inmunitarios en el moco de la piel de dorada (*Sparus aurata*) de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S). Actividad lisozima (A) y actividad bactericida contra *V. harveyi* (B) y *V. anguillarum* (C). Los valores se expresan como media \pm SEM (n=9).

5.4. Diversidad y composición de la microbiota del moco de la piel

Se obtuvieron un total de $6.683.517 \pm 1.001,15$ lecturas de alta calidad, correspondientes a 139.240 lecturas por muestra, con un mínimo de 119.827 y un máximo de 149.837 lecturas totales por muestra. En cuanto al grupo C, se reportaron $138.356 \pm 3.243,92$ lecturas medias a t0, 137.731 lecturas medias $\pm 1.950,04$ en el tiempo t14 y 135.576 lecturas medias $\pm 1.895,79$ correspondientes al t28. Por otro lado, se reportaron $136.011 \pm 2.487,85$ lecturas medias correspondientes a t0, $140.099 \pm 2.390,53$ lecturas medias correspondientes a t14 y $142.907 \pm 2.790,05$ lecturas medias correspondientes a t28. Se asignaron un total de 3.713 OTUs con un umbral de identidad del 97%. Las curvas de rarefacción se aproximaron a la saturación, por lo que el número de secuencias obtenidas se consideró apropiado para realizar el análisis (**Fig. 10**).

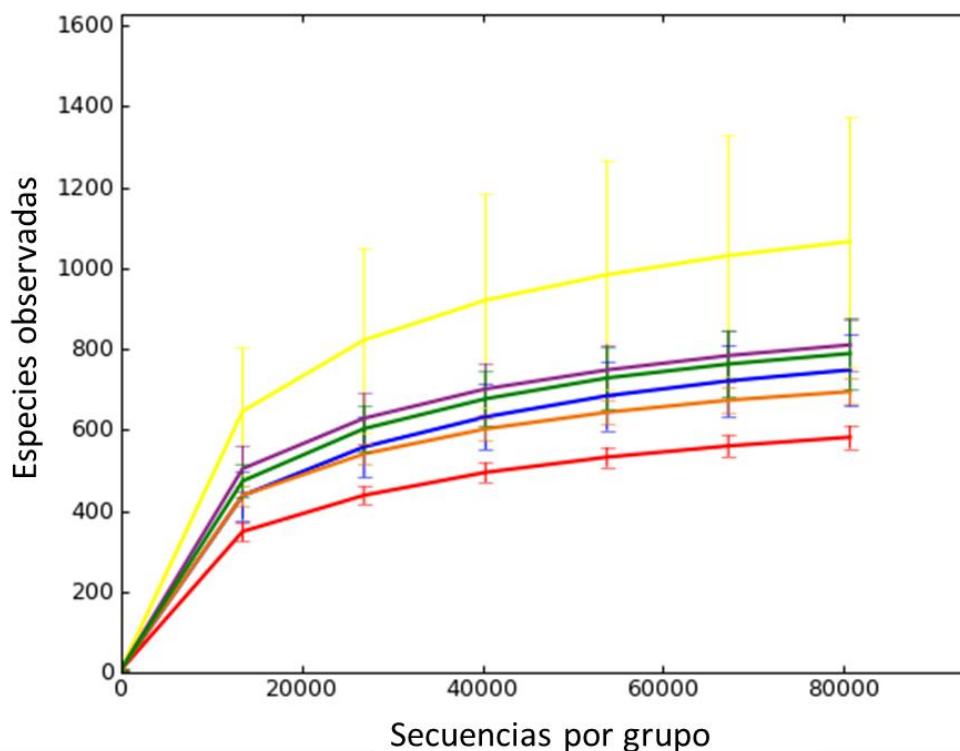


Figura 10. Curvas de rarefacción obtenidas a partir de datos de secuenciación de muestras de moco de la piel de dorada (*Sparus aurata*) de los diferentes grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S).

5.4.1. Índices de diversidad

La diversidad y riqueza de las poblaciones bacterianas del moco de la piel de los 6 grupos experimentales se estudiaron a través de métricas de diversidad alfa (índices Chao1, Shannon e inverso-Simpson) (**Tabla 5**). La riqueza total esperada calculada por Chao1 mostró diferencias significativas entre ambos grupos, siendo el índice de Chao1 del grupo crónicamente estresado (S) significativamente mayor ($p < 0,05$) (**Tabla 5**). Con respecto a la diversidad total esperada calculada por el índice de Shannon, S14 y S28 fueron significativamente más altos que C14 y C28, respectivamente. Además, se observaron diferencias significativas en el índice de diversidad calculado por el inverso-Simpson siendo el índice S14 y el S28 significativamente superiores a C14 y C28, respectivamente (**Tabla 5**).

Tabla 5. Índices de diversidad alfa por grupos (promedio \pm DE). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos experimentales: control (C) y crónicamente estresado (S) comparadas entre los mismos tiempos de muestreo (prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney, $p < 0,05$).

| Tiempo experimental ¹ | Chao1 | | Shannon | | Inverso-Simpson | |
|----------------------------------|--------------------|---------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| | C | S | C | S | C | S |
| T0 | 654,27 \pm 65,64 | 867,49 \pm 113,78 | 4,5 \pm 0,53 | 4,95 \pm 0,36 | 0,88 \pm 0,04 | 0,9 \pm 0,02 |
| T14 | 827,99 \pm 96,30 | 888,49 \pm 77,05 | 4,51 \pm 0,63 | 5,16 \pm 0,91 * | 0,86 \pm 0,05 | 0,89 \pm 0,12 * |
| T28 | 744,82 \pm 28,53 | 1201 \pm 404,57 * | 5,15 \pm 0,36 | 5,82 \pm 0,33 * | 0,92 \pm 0,02 | 0,95 \pm 0,01 * |

¹Días

Asimismo, se determinó la diversidad beta de la microbiota de moco de la piel de los peces de los grupos C y S, y se estudió la estructura de la comunidad mediante el análisis de coordenadas principales (PCoA). El análisis de similitud (Anosim) mostró diferencias significativas entre las comunidades C14-S14 (valor R 0,49, $p= 0,001$). En el caso de la comparación entre C28-S28, el resultado estuvo en el límite de los parámetros establecidos, por lo que no se consideró significativo (valor R 0,19, $p= 0,05$) (**Fig. 11**).

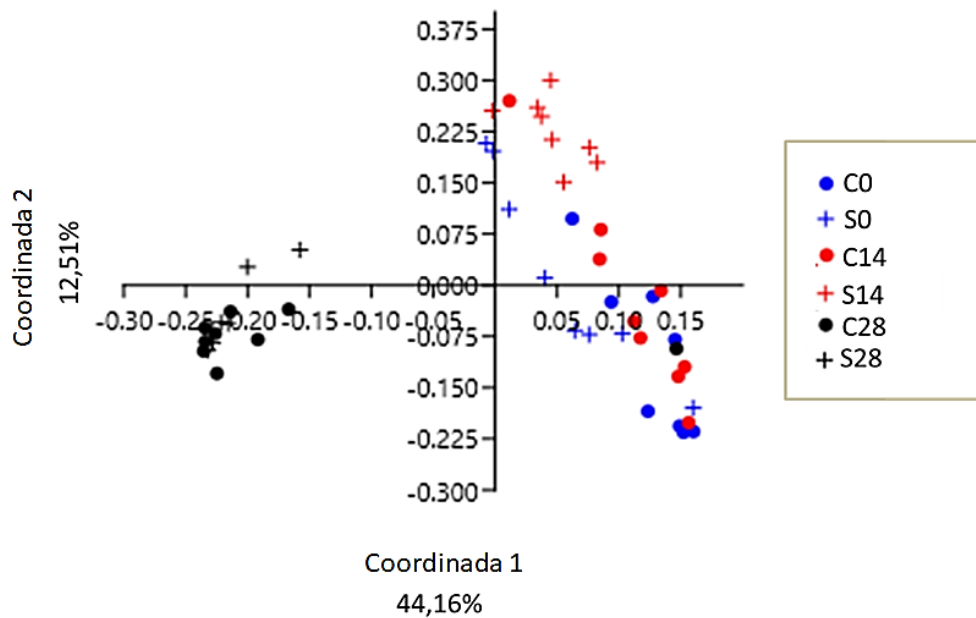


Figura 11. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de las muestras de moco de la piel de dorada (*Sparus aurata*) de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S) en los diferentes tiempos experimentales (0, 14 y 28 días).

5.4.2. Taxonomía

La composición taxonómica a nivel de filo mostró a Proteobacterias, Bacteroidetes, Verrucomicrobia y Actinobacteria como los filos dominantes (abundancia relativa >1%) en los grupos C y S. En el grupo C, Proteobacteria representó el 83.62%, Bacteroidetes 11,59%, Actinobacteria 1,39% y Verrucomicrobia 1,30% mientras que en el grupo S Proteobacterias representó el 79,25%, Bacteroidetes 13,48%, Verrucomicrobia 2,87% y Actinobacteria 1,56%. Estos números corresponden a la media de los tres tiempos experimentales (**Fig. 12**).

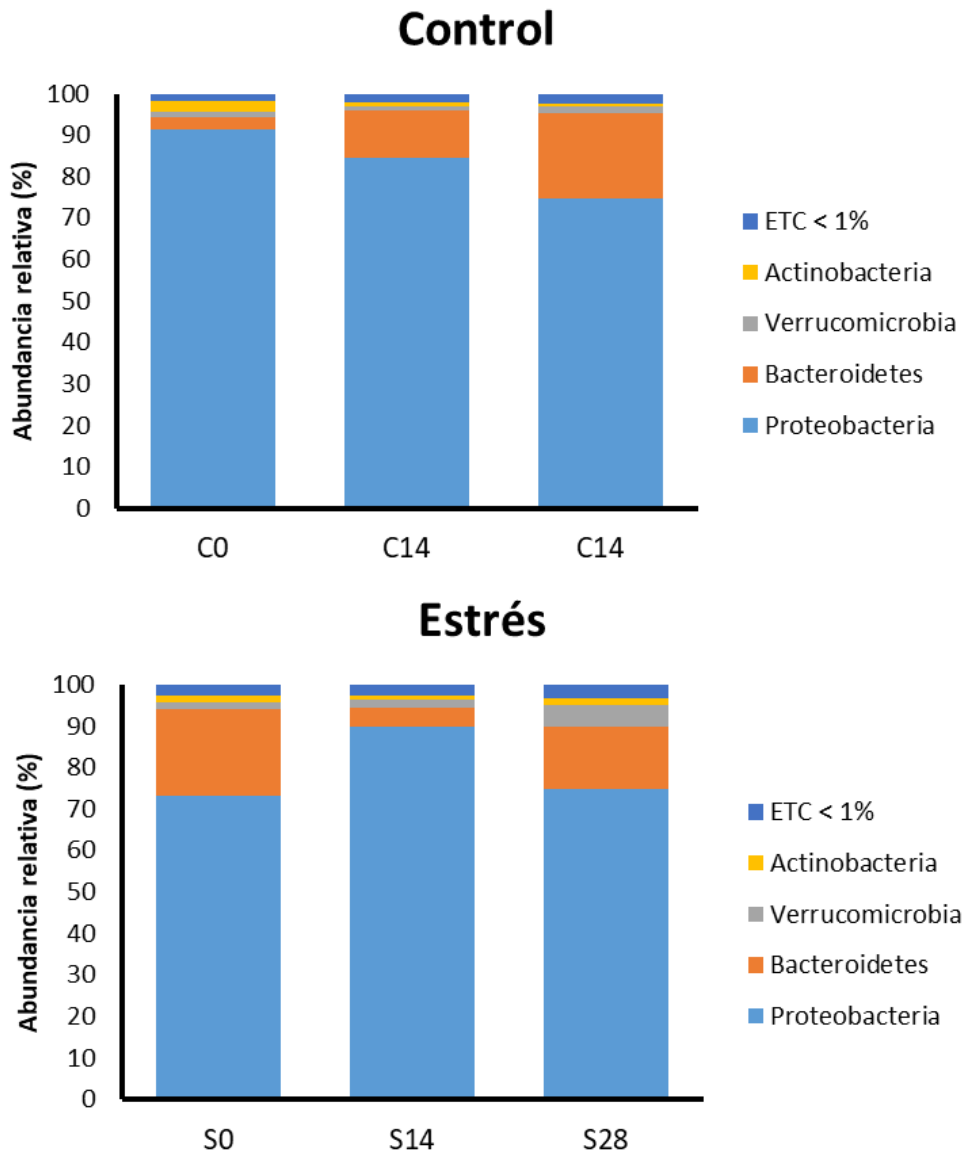


Figura 12. Abundancia relativa media (%) a nivel de filo por grupos de las muestras de moco de la piel de dorada (*Sparus aurata*) de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S). ETC incluye taxones con menor abundancia 1%.

A nivel de clase, 6 clases mostraron porcentajes de abundancia relativa superiores al 1% en todas las muestras: γ -Proteobacteria, α -Proteobacteria, Bacteroidia, Verrucomicrobiae, Actinobacteria y δ -Proteobacteria. γ -Proteobacteria (56,82%) seguida de α -Proteobacteria (26,35%), Bacteroidia (11,51%), Verrucomicrobiae (1,29%) y Actinobacteria (0,74%) se detectaron en la microbiota de peces C. En los peces S, se observó abundancia de γ -Proteobacteria (52,38%) seguida de α -Proteobacteria (26,17%), Bacteroidia (13,37%), Verrucomicrobiae (2,87%), Actinobacteria (0,47%) y δ -Proteobacteria (0,37%) (Fig. 13).

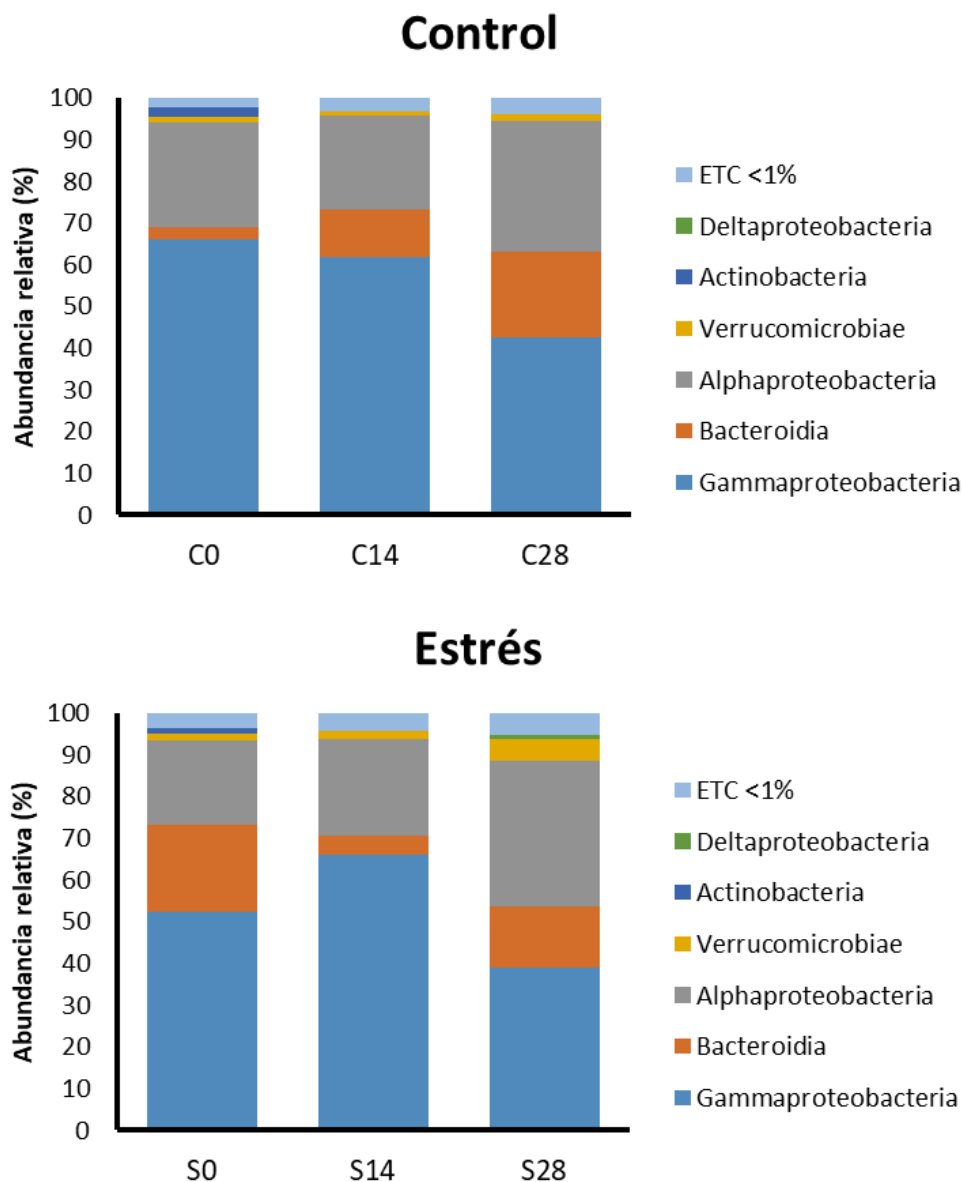


Figura 13. Abundancia relativa media (%) a nivel de clase por grupos de las muestras de moco de la piel de dorada (*Sparus aurata*) de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S). ETC incluye taxones con menor abundancia 1%.

Cuando se consideró la microbiota a nivel de género, se detectaron *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Tenacibaculum*, *NS3a_marine_group*, *Marivita*, *Glaciecola*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Sulfitobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas*, *Ruegeria*, *Rubritalea*, *Marinagarivorans*, *Phaeocystidibacter*, *Lentibacter*, *Candidatus_Aquiluna*, *Thalassobius* y *Pseudohongiella*, con porcentajes de abundancia relativos >1%. Aunque con diferentes porcentajes dependiendo del tratamiento y el tiempo, los géneros más abundantes correspondieron a *Acitenobacter* (32,36% y 21,91%, C/S, respectivamente) y *Marivita* (13,37% y 11,96% C/S, respectivamente) (Fig. 14).

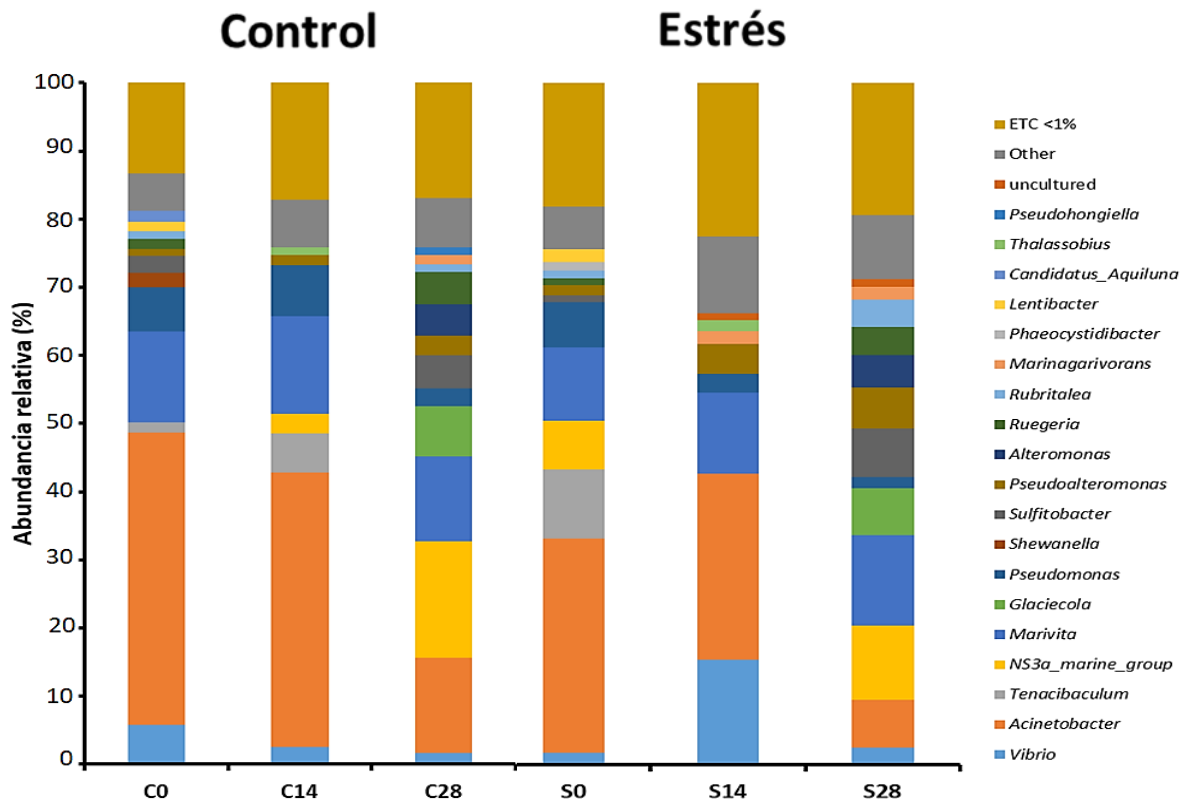


Figura 14. Abundancia relativa media (%) a nivel de género por grupos de las muestras de moco de la piel de dorada (*S. aurata*) de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S). ETC incluye taxones con menor abundancia 1%.

Para finalizar, se analizaron las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la taxonomía (t-test, $p < 0,05$) entre los ejemplares de los grupos C y S muestreados a los 14 y 28 días (**Fig. 15**). A los 14 días, se encontraron diferencias significativas entre los grupos C y S solo a nivel de género. En concreto, en S14 se observó una disminución de la abundancia de los géneros *Acinetobacter*, *NS3a_marine_group* y *Pseudomonas*, mientras que *Pseudoalteromonas* y *Marinagarivorans* aumentaron significativamente.

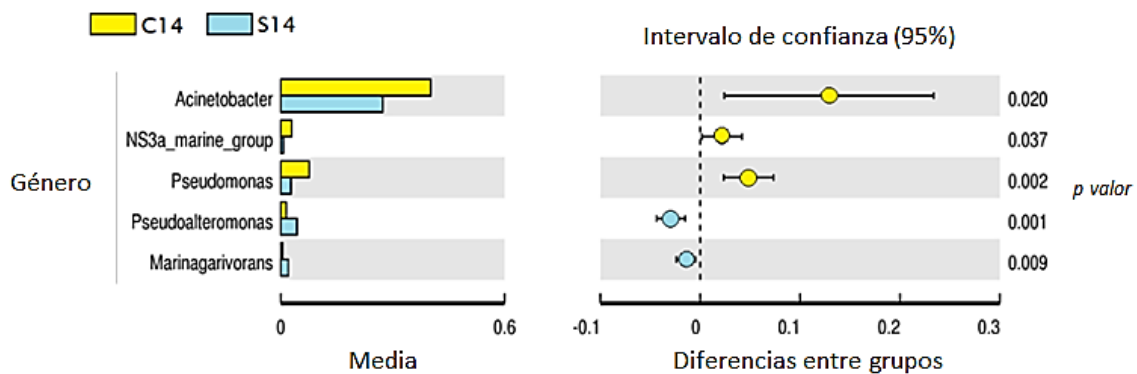


Figura 15. Diferencias significativas de la prueba t ($p < 0,05$) en los diferentes niveles taxonómicos. Se representaron los valores relativos a los medios de abundancia de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S) a los 14 días.

Con respecto a los 28 días, también se encontraron diferencias significativas entre los peces de los grupos C y S. En particular, hubo un aumento significativo de los filos Verrucomicrobia y Actinobacteria, específicamente de la clase Verrucomicrobiae y Actinobacteria respectivamente en el grupo S28 en comparación al grupo C28. Además, la abundancia de la clase δ -Proteobacteria en el grupo S28 aumentó significativamente con respecto al grupo C28. A nivel de género, *Pseudoalteromonas* y *Rubritalea* también mostraron una abundancia significativamente mayor en S28 frente a C28 (**Fig.16**).

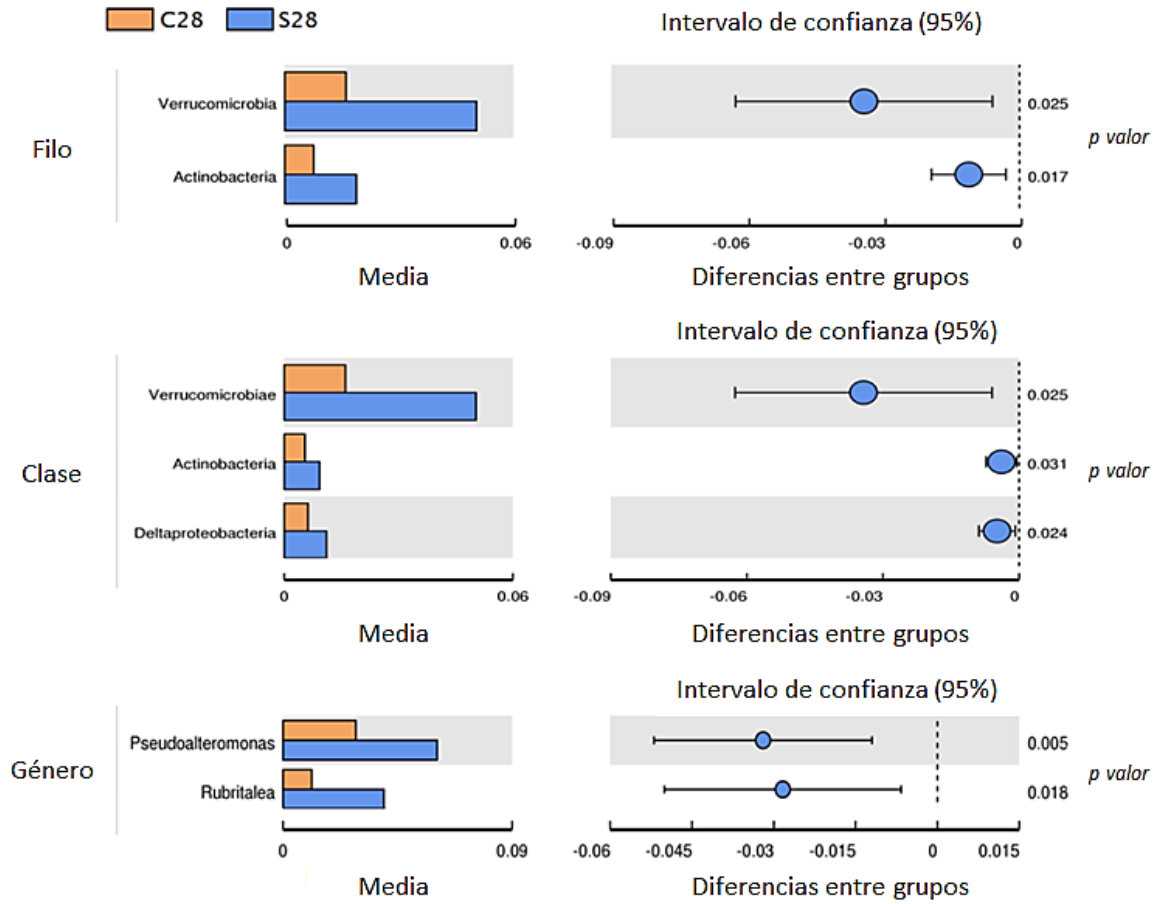


Figura 16. Diferencias significativas de la prueba t ($p < 0,05$) en los diferentes niveles taxonómicos. Se representaron los valores relativos a los medios de abundancia de los grupos experimentales: grupo control (C) y grupo crónicamente estresado (S) a los 28 días.

Capítulo 2:

Modulación de la respuesta inmunitaria (sistémica y local) y de la microbiota de la mucosa de la piel de lubina (*Dicentrarchus Labrax*) tras una infección causada por *Vibrio harveyi*.

| | Pág. |
|-------------------------|------|
| 1. Resumen | 60 |
| 2. Resumen gráfico | 61 |
| 3. Introducción | 62 |
| 4. Materiales y métodos | 62 |
| 5. Resultados | 68 |

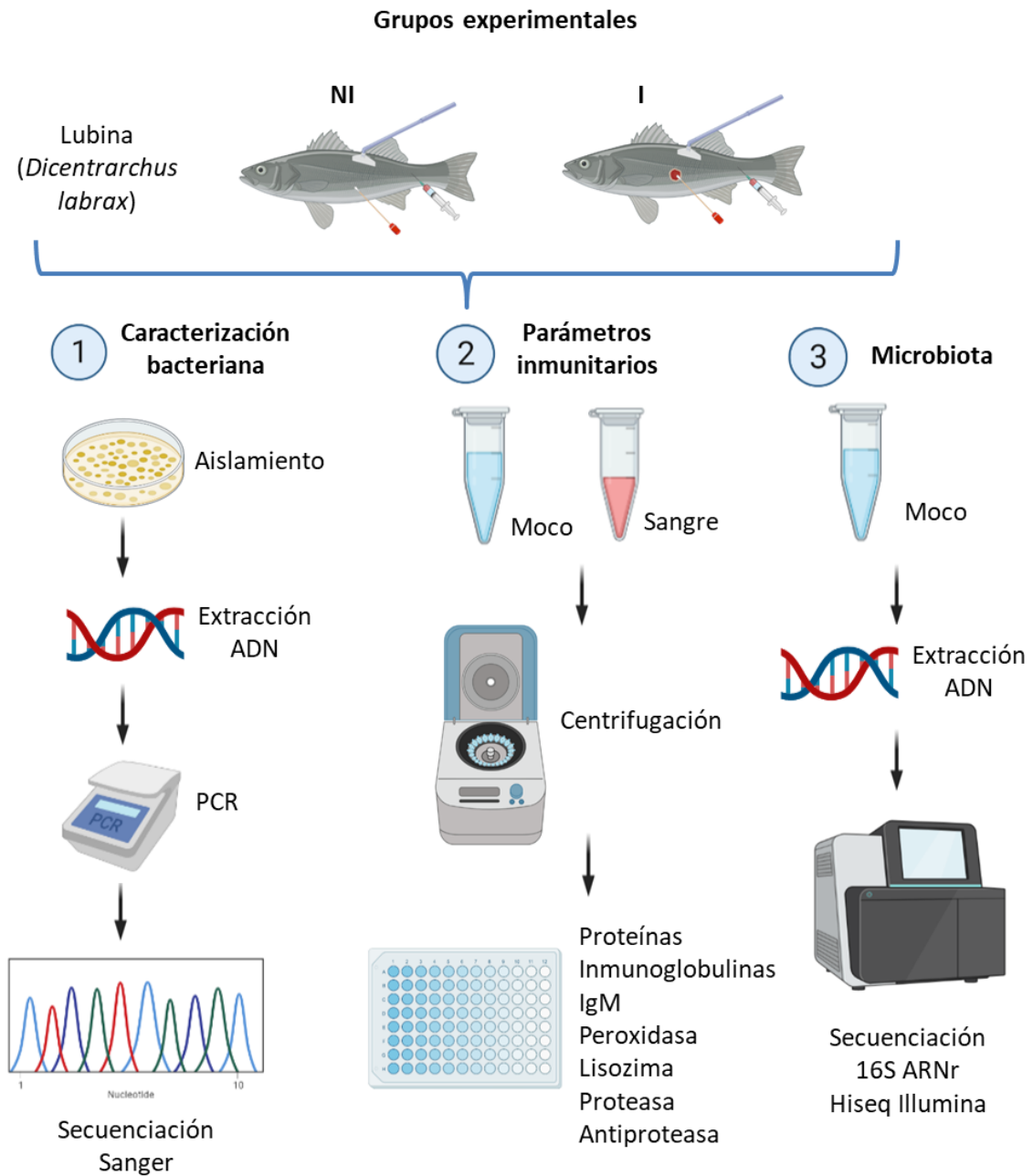
1. Resumen

Los brotes de enfermedades siguen siendo uno de los principales obstáculos para el desarrollo sostenible de la industria de la acuicultura. En la acuicultura marina, muchas especies del género *Vibrio* son patógenos oportunistas graves responsables de importantes pérdidas para los productores. En este capítulo, los efectos sobre la respuesta inmunitaria y la microbiota de la piel de la lubina se estudiaron después de un brote natural de una enfermedad causada por *V. harveyi*.

En cuanto a la respuesta inmunitaria local, se observó una disminución en la actividad de la proteasa en los peces infectados. Con respecto a la respuesta inmunitaria sistémica, se observó una disminución en la actividad de proteasa y lisozima mientras que la actividad de peroxidasa mostró un aumento significativo en peces infectados. Se observó una clara disbiosis en la microbiota del moco de la piel en peces infectados en comparación con peces no infectados. Además, *V. harveyi*, fue identificado como biomarcador para el grupo infectado mientras que el género *Rubritalea* fue reportado para peces sanos.

Este estudio destaca la importancia de caracterizar las superficies mucosas y la composición microbiana del moco de la piel para detectar posibles brotes de enfermedades en las piscifactorías.

2. Resumen gráfico



3. Introducción

Debido a la intensificación de la producción en sistemas acuícolas, los brotes de enfermedades siguen siendo una de las principales limitaciones para el desarrollo sostenible de la industria acuícola (Opiyo y col., 2018). En la acuicultura marina, muchas especies del género *Vibrio* son patógenos oportunistas que afectan tanto a vertebrados como invertebrados y son responsables de pérdidas significativas para los productores (Ina-Salwany y col., 2019). En peces, los principales cambios en el comportamiento asociados a la vibriosis son el letargo, la anorexia o patrones anormales de natación. Con respecto a cambios externos, se han observado lesiones ulcerosas y cambios en la pigmentación (oscurecimiento) en la piel, distensión abdominal, necrosis branquial (Noga, 2000). Si no es tratada, la infección puede volverse sistémica lo que conlleva la mortalidad del huésped (Ina-Salwany y col., 2019).

En los últimos años, los investigadores han estudiado cómo influye la microbiota en el sistema inmunitario ya que es de vital importancia para la resistencia a las enfermedades en los peces (Kelly y Salinas, 2017). El presente capítulo tiene como objetivo caracterizar la modulación del sistema inmunitario, tanto sistémico como local, así como analizar composición microbiana en el moco de la piel, en un episodio de infección natural por *V. harveyi* en otra especie de gran importancia en la acuicultura mediterránea, la lubina (*D. labrax*).

4. Materiales y métodos

4.1. Aclimatación de los peces y aparición de la enfermedad

Un total de 60 ejemplares de lubina fueron obtenidos de una piscifactoría local (Alicante, España) y fueron transportados a las Instalaciones de Peces Marinos de la Universidad de Murcia. Los peces se distribuyeron aleatoriamente en tres acuarios con recirculación de agua marina (250 L) (20 peces por acuario) con las mismas condiciones

descritas en el capítulo 1. Los peces fueron alimentados con una dieta comercial (Skretting, D2) a una tasa del 2% de peso corporal por día.

Durante el período de aclimatación, unos diez días después de su llegada a nuestra instalación, observamos la aparición de lesiones de la piel en algunos animales de todos los tanques, lo que nos hizo sospechar de una posible infección. Un total de 18 ejemplares (de un peso medio $22,15 \pm 5,66$ g y una longitud media de $12,22 \pm 0,89$ cm) fueron muestreados. De los 18 peces, 9 fueron seleccionados (3 de cada acuario) por sus notables lesiones macroscópicas externas en su piel (grupo infectado, I) mientras que otros 9 fueron seleccionados (3 peces de cada acuario) por no tener ninguna sintomatología externa de enfermedad (grupo no infectado, NI). Más específicamente, 6 peces cohabitantes fueron muestreados de cada acuario (3 I y 3 NI).

4.2. Toma de muestras

Antes del muestreo, los peces fueron anestesiados con aceite de clavo ($0,1 \text{ g L}^{-1}$). En primer lugar, con el fin de demostrar una posible etiología bacteriana de las lesiones macroscópicas observadas y luego, del brote de la enfermedad, hisopos estériles de algodón fueron frotados suavemente contra las heridas macroscópicas y empleados para sembrar en placas del medio *Flexibacter maritimus* (FMM, Lab-Conda, Madrid, España). Además, muestras de riñón medio (RM) y riñón cefálico (RC) fueron tomadas de los peces que mostraron síntomas externos de enfermedad con el fin de demostrar que la infección estaba establecida a nivel sistémico. Las placas fueron incubadas a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h.

Posteriormente, se recogieron muestras de moco de la piel y de sangre de la vena caudal utilizando el método descrito por [Guardiola y col., \(2014\)](#), como ya se ha descrito en el [capítulo 1 sección 3.2](#).

Para terminar, se determinó el peso corporal y la longitud de cada pez.

4.3. Caracterización bacteriana

Los aislados bacterianos que crecieron en las placas inoculadas con lesiones de la piel, RM y RC fueron clasificados al nivel de especie por amplificación y secuenciación del fragmento 16S ADNr. Se extrajo ADN genómico completo de las bacterias utilizando el *Thermo Scientific Gene JET Genomic DNA Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Después, este fragmento se amplificó utilizando los cebadores universales SD-Bact-0008-a-S20 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') y SD-Bact-1492-a-A-19 (5' GGT TAC CTT GTTACG ACT T) (Kim y col., 2007). Las reacciones PCR se llevaron a cabo en una mezcla de 50 µl que incluía 5 pmol de cada primer, una mezcla de dNTPs de 0,2 mM, 10X DreamTaq Buffer, 2 mM MgCl₂, 1.25 U *DreamTaq DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y 1 µl de ADN de colonia (~ 100 ng µl⁻¹). El perfil de la PCR fue el siguiente: 2 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 40 s a 52 °C y 1,3 min a 72 °C y un paso final 5 min a 72 °C. Los productos de la reacción PCR fueron electroforados en un gel de agarosa del 1% y visualizado con transiluminación ultravioleta. Antes de la secuenciación del producto PCR, se realizó un paso de purificación ExoSAP-IT. Para ello, 9 µl de cada producto de la PCR se mezcló con 0,5 µl de ExoI (20 U µL⁻¹) (Thermo Fisher Scientific, Germany). Los productos PCR fueron purificados enzimáticamente (37 °C durante 15 min, 80 °C durante 15 min). Posteriormente, fueron secuenciados utilizando la tecnología *Sanger* en Macrogen (Madrid, España). Utilizando el software de herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST), y las secuencias se compararon con los de las bases de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast, a la que se tuvo acceso el 27 de abril de 2021).

4.4. Parámetros inmunitarios

Los niveles de proteína, inmunoglobulinas, IgM, y actividades peroxidasa y lisozima fueron determinados utilizando los protocolos ya descritos en el **capítulo 1 sección 3.5.2.**

4.4.1. Actividad proteasa

La actividad proteasa se analizó utilizando el ensayo de hidrólisis de azocaseína con ligeras modificaciones (Ross y col., 2000). El moco de la piel o el suero fueron reemplazados por tripsina (5 mg ml⁻¹, Sigma-Aldrich) en los controles positivos y el tampón de bicarbonato de amonio fue utilizado para los controles negativos. Las placas se leyeron a 450 nm en un lector de placas (SPECTRO^{starnano}, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). La actividad proteasa de cada muestra se expresó como porcentaje (%) de actividad proteasa en relación a los controles.

4.4.2. Actividad antiproteasa

La actividad antiproteasa del moco de la piel o suero fue determinada por la capacidad para inhibir la actividad de la tripsina (Hanif y col., 2004). El moco de la piel y el suero fueron reemplazados por bicarbonato de amonio y tripsina (5 mg ml⁻¹, Sigma Aldrich) para los controles positivos o por el tampón de bicarbonato de amonio para los controles negativos. Las placas se leyeron a 450 nm en un lector de placas (SPECTRO^{starnano}, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). La actividad antiproteasa para cada muestra se expresó como % de actividad antiproteasa en relación con los controles. La actividad antiproteasa no se detectó en el moco de la piel.

4.5. Análisis de la microbiota

4.5.1. Preparación de secuenciación y generación de bibliotecas

El ADN total de todas las muestras fue extraído de moco de la piel usando el protocolo de [Tapia-Paniagua y colaboradores \(2010\)](#), con modificaciones menores. La integridad y pureza del ADN fueron monitoreadas en geles de agarosa 1%. La concentración se determinó mediante el uso de Qubit 2.0 fluorímetro (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). En total, 8 muestras de peces NI y 7 muestras de peces I superaron los requisitos de calidad del ADN para la preparación y secuenciación de la biblioteca. La amplificación del gen 16S ADNr (región V3-V4) se llevó a cabo utilizando los cebadores 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') y 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3').

4.5.2. Procesamiento de datos de secuenciación

Las lecturas de extremos emparejados se asignaron a muestras basadas en sus códigos de barras únicos y truncados cortando el código de barras y las secuencias de cebadores. Las lecturas de extremos emparejados se fusionaron usando FLASH (V1.2.7) ([Bokulich y col., 2013](#)) y fueron filtradas con el promedio de puntuación de calidad Phred ≥ 20 , según el proceso de control de calidad QIIME (V1.7.0) ([Edgar y col., 2011](#)). UCHIME se utilizó para detectar y eliminar secuencias de quimeras ([Haas y col., 2011](#)).

4.5.3. Agrupación de OTUS y asignación taxonómica

El resto de las secuencias representativas, no quiméricas, fueron analizadas con el Software UPARSE (V7.0.1001) y asignadas a unidades taxonómicas operativas al 97% de similitud. La anotación en cada rango taxonómico se realizó contrastando con SILVA Database (versión 138) con el software Mothur (umbral de confianza 0,8–1).

Después de generar el perfil taxonómico de las muestras, las curvas de rarefacción fueron calculadas. La información de abundancia de OTU se normalizó utilizando el número de secuencia que correspondía a la muestra con el menor número de lecturas para las que las curvas de rarefacción fueran asintóticas (47.067). Los análisis posteriores de la diversidad alfa (índices Chao1, Shannon e inverso de Simpson) y la diversidad beta se realizaron utilizando este conjunto de datos normalizados.

4.5.4. Diversidad alfa y beta

Se estimó la diversidad alfa basada en los índices Chao1, Shannon e inverso-Simpson. Las curvas de rarefacción se obtuvieron trazando el número de OTU observados contra el número de secuencias. El coeficiente de cobertura se calculó con el fin de determinar el nivel de profundidad de secuenciación. Todos estos cálculos se realizaron con QIIME (V. 1.7.0) y se mostraron con el software R (V. 2.15.3).

El análisis de diversidad beta se utilizó para evaluar las diferencias de muestras entre grupos. El análisis de escala multidimensional no métrica (NMDS) se realizó utilizando Software R (V. 2.15.3). El análisis discriminante lineal (ADL), efecto-tamaño (LEfSe) fue utilizado para determinar biomarcadores microbianos.

4.6. Análisis estadístico

Los resultados relacionados con los parámetros inmunes se expresaron como medias \pm error estándar (SEM). La normalidad de las variables fue confirmada por la prueba Shapiro-Wilk mientras que la homogeneidad de la varianza fue confirmada por la de Levene. Los datos fueron estadísticamente analizados por la prueba T de student para determinar diferencias significativas entre los grupos experimentales (infectados y no infectados). El nivel de significación fue del 95% en todos los casos ($p < 0,05$). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism 8 y las diferencias significativas fueron consideradas cuando $p < 0,05$. Todas las determinaciones se realizaron en triplicados.

5. Resultados

5.1. Lesiones de la piel

En la siguiente figura se muestran ejemplares representativos de este estudio (**Fig. 17**). En la columna de la izquierda (A-C) se pueden observar a los ejemplares considerados sanos, los cuales no presentaban ninguna lesión aparente mientras que en la columna de la derecha (D-F) se pueden observar a los ejemplares considerados afectados por una posible infección bacteriana, los cuales presentaban lesiones ulcerosas en la piel.

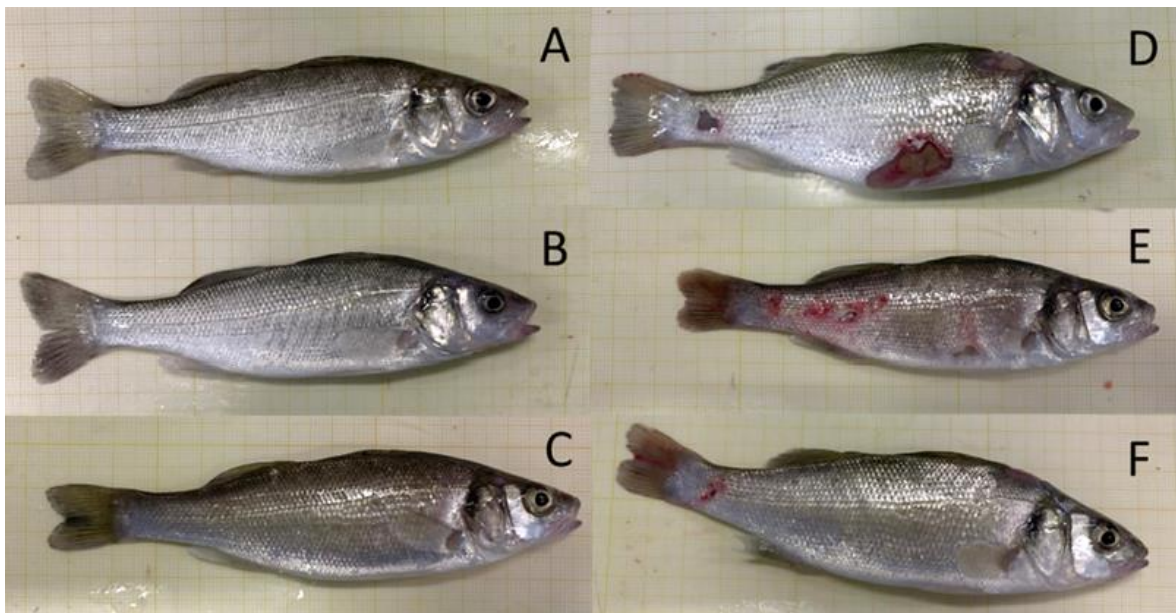


Figura 17. Fotografías de ejemplares representativos de lubinas (*Dicentrarchus labrax*) pertenecientes a los grupos no infectado (A-C) o infectado (D-F).

5.2. Caracterización bacteriana

Cepas bacterianas aisladas de las heridas de la piel, así como de las muestras de RM y RC de lubina fueron identificadas como *V. harveyi*, según el análisis de ADNr 16S y aparecieron como un cultivo puro en el 73,40% de las muestras (**Tabla 6**). Esta presencia de crecimiento bacteriano indicó que los animales con síntomas estaban afectados por vibriosis por lo que los peces se dividieron en dos grupos, no infectados e infectados, para su estudio posterior.

Tabla 6. Cepas bacterianas aisladas a partir de úlceras de la piel, de riñón medio y cefálico de lubinas (*Dicentrarchus labrax*) con signos de infección.

| Caracterización bacteriana (gen ADN ribosomal 16S) | | |
|--|--|-------------------|
| Órgano | Cepa bacteriana | Secuencia parcial |
| Piel | <i>V. harveyi</i> strain 2SYX001 | 97,48% |
| | <i>V. harveyi</i> ATCC:35084 | 95,88% |
| | <i>V. harveyi</i> strain SETBT4 | 96,88% |
| | <i>V. harveyi</i> strain DS1810-S6_1 | 97,23% |
| | <i>V. harveyi</i> strain SF-1 | 96,33% |
| | <i>V. harveyi</i> strain NBRC | 97,25% |
| | <i>Pseudoalteromonas</i> sp. strain 4634 | 97,40% |
| | <i>Pseudoalteromonas</i> sp. QD254Down-1 | 96,46% |
| | <i>Pseudoalteromonas</i> sp. QD254Down-1 | 98,07% |
| Riñón medio | <i>V. harveyi</i> strain HW | 96,85% |
| | <i>V. harveyi</i> strain HW | 96,92% |
| | <i>V. harveyi</i> strain HW | 96,91% |
| Riñón cefálico | <i>V. harveyi</i> strain SF-1 | 97,17% |
| | <i>V. harveyi</i> strain HW | 96,23% |
| | <i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> strain M4C_0m_07 | 97,94% |

5.2. Respuesta inmunitaria

5.2.1. Inmunidad sistémica

No se observaron diferencias significativas en los valores de las Igs totales ni en los niveles totales de IgM entre el suero de peces NI o I con *V. harveyi* (**Fig. 18**).

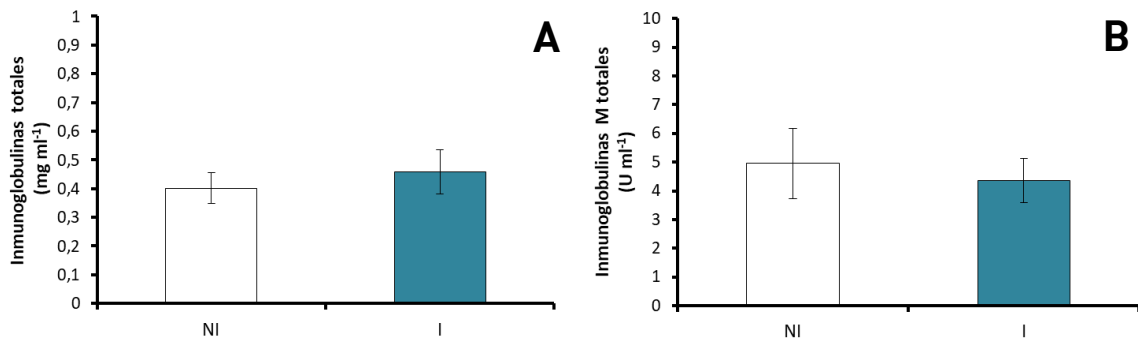


Figura 18. Respuesta inmunitaria en suero de lubinas (*Dicentrarchus labrax*) no infectadas (NI) o infectadas (I). Niveles totales de inmunoglobulinas (A) e IgM (B). Los datos se representan como media \pm SEM (n = 9).

Sin embargo, se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en la actividad peroxidasa en peces infectados, en comparación con los resultados obtenidos en los peces NI (**Fig. 19**). Por el contrario, los valores de las actividades lisozima y proteasa se redujeron significativamente en suero de peces I con respecto a los valores registrados en peces NI (**Fig. 20**). No hubo diferencias significativas en la actividad antiproteasa sérica entre ambos grupos de peces (**Fig. 19**).

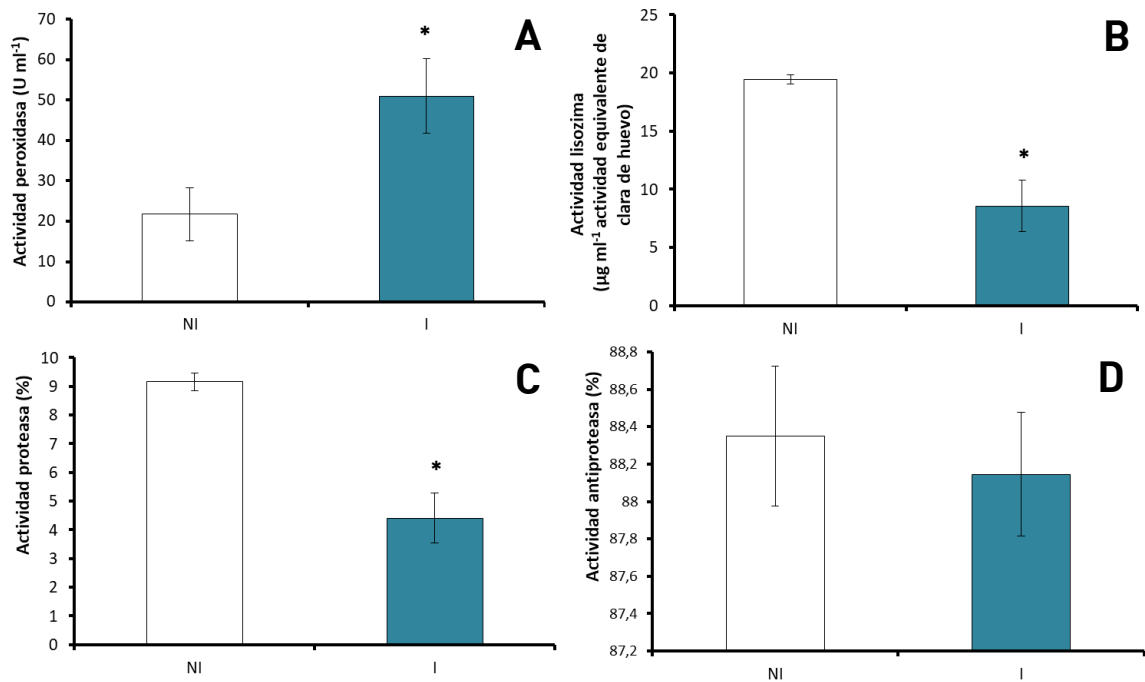


Figura 19. Respuesta inmunitaria en suero de lubinas (*Dicentrarchus labrax*) no infectadas (NI) o infectadas (I). Resultados de peroxidasa (A), lisozima (B), proteasa (C) y antiproteasa (D). Los datos se representan como media \pm SEM (n = 9). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$).

5.2.2. Inmunidad local

Los valores de las proteínas, Igs totales e IgM en el moco de la piel de los peces I y NI no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) (**Fig. 20**).

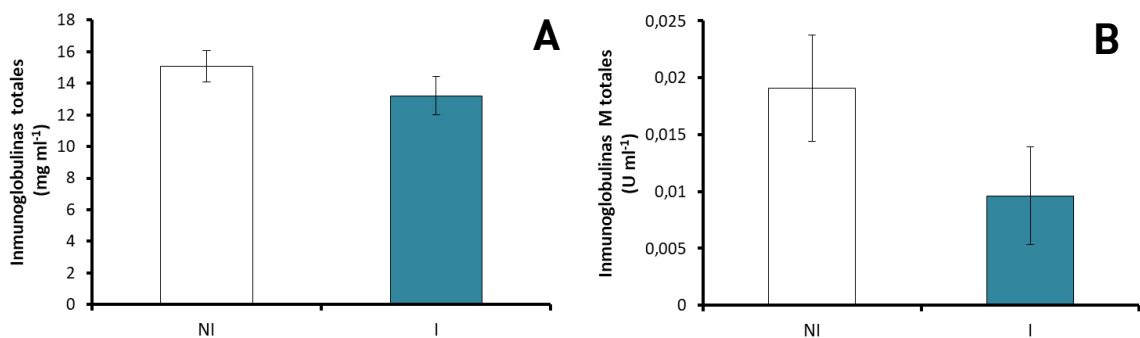


Figura 20. Respuesta inmunitaria del moco de la piel en lubinas (*Dicentrarchus labrax*) no infectadas (NI) e infectadas (I). Niveles totales inmunoglobulinas (A) e IgM (B). Los datos se representan como media \pm SEM (n = 9).

Sin embargo, se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la actividad proteasa en el moco de la piel en peces I en comparación con los valores obtenidos en peces NI, mientras que no se obtuvieron diferencias significativas en la actividad peroxidasa y en la lisozima (**Fig. 21**). Por último, la actividad antiproteasa no fue detectada en muestras de moco de piel de lubina.

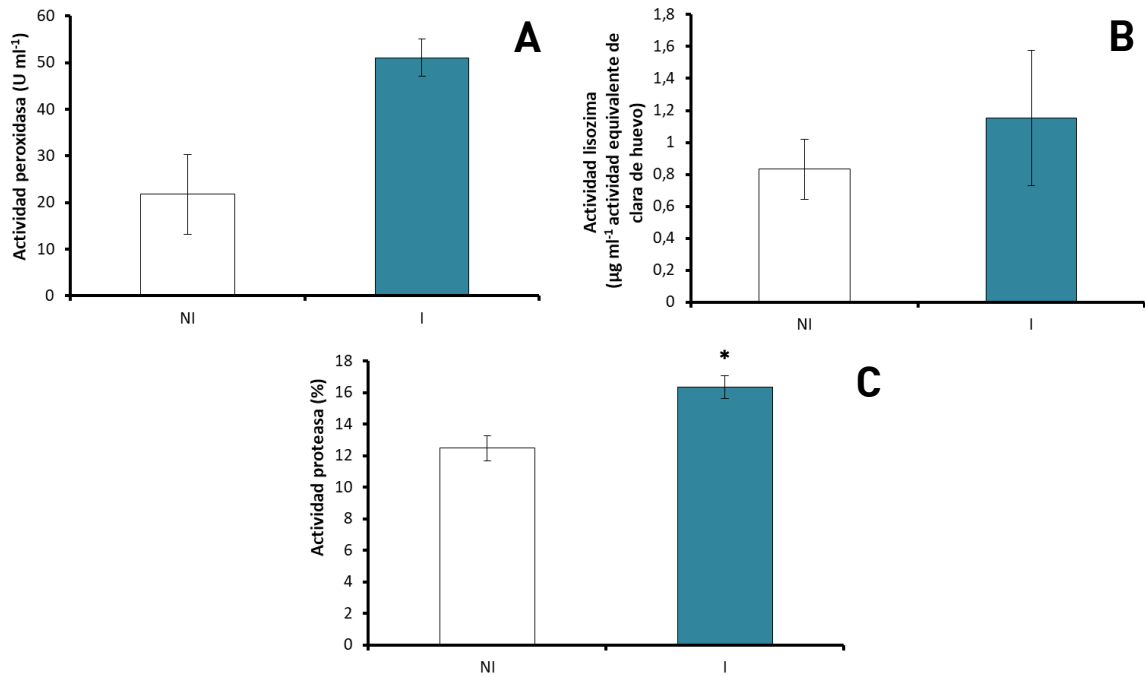


Figura 21. Respuesta inmunitaria del moco de la piel en lubinas (*Dicentrarchus labrax*) no infectadas (NI) e infectadas (I). Actividades peroxidasa (A), lisozima (B) y proteasa (C). Los datos se representan como media \pm SEM (n = 9). Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$).

5.3. Diversidad y composición de la microbiota del moco de la piel

Se obtuvieron un total de 1.743.391 lecturas de alta calidad, correspondientes a $116.226 \pm 6.283,30$ lecturas por muestra. En cuanto a los grupos experimentales, $100.776 \pm 7.807,40$ lecturas medias correspondieron al grupo NI, $133.884 \pm 4.323,35$ lecturas medias al grupo I, encontrando un mínimo de 60.282 lecturas y un máximo de 148.579 lecturas en las muestras.

Un total de 3.555 OTUs fueron asignados con un umbral de identidad del 97%. Las curvas de rarefacción se aproximaron a la saturación a las 47.067 lecturas. Por lo tanto, este número de secuencias se consideró apropiado para normalización (**Fig. 22**).

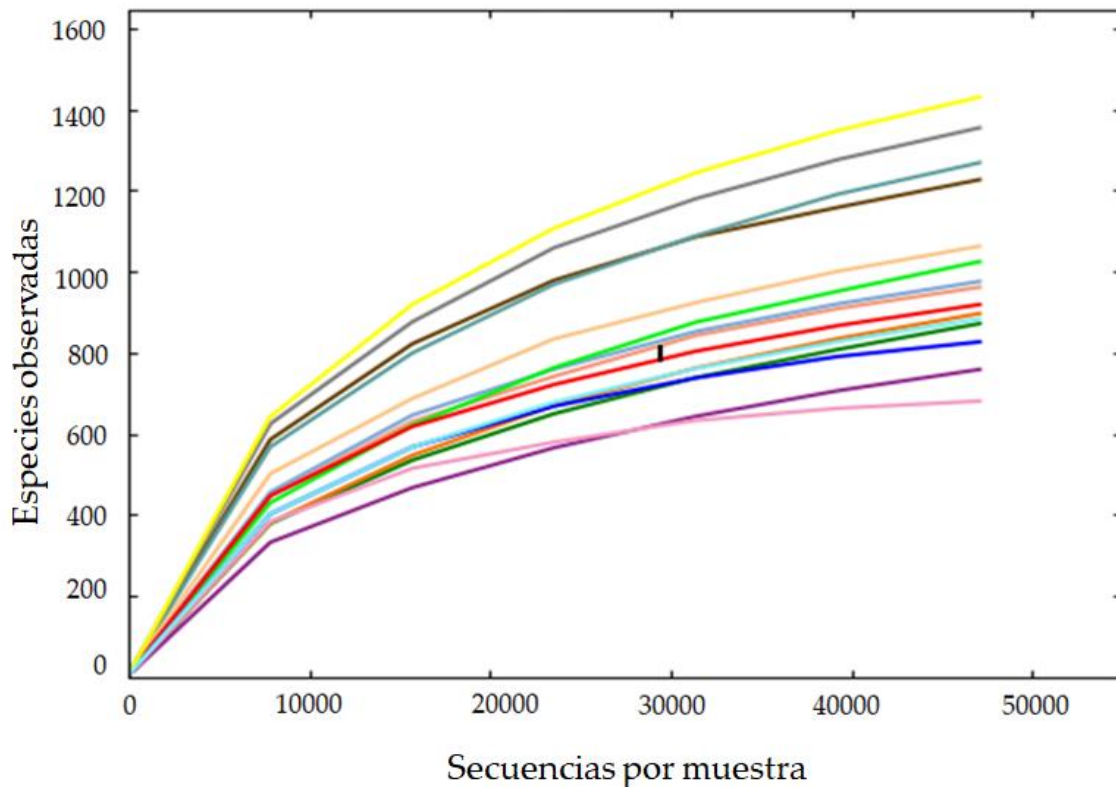


Figura 22. Curvas de rarefacción obtenidas de los datos de secuenciación de las distintas muestras de moco de la piel de lubinas (*Dicentrarchus labrax*) no infectadas (NI) o infectadas (I).

5.3.1. Diversidad alfa

La diversidad y riqueza de las poblaciones bacterianas del moco de la piel de los dos grupos experimentales fueron estudiados a través de métricas de diversidad alfa (índices Chao1, Shannon e inverso de Simpson). La riqueza total esperada calculada por el índice Chao1, así como el índice de diversidad inverso de Simpson no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en el índice de Shannon ($p < 0,05$), siendo significativamente mayor en el moco de los peces I, en comparación al índice obtenido para los peces NI (**Fig. 23**).

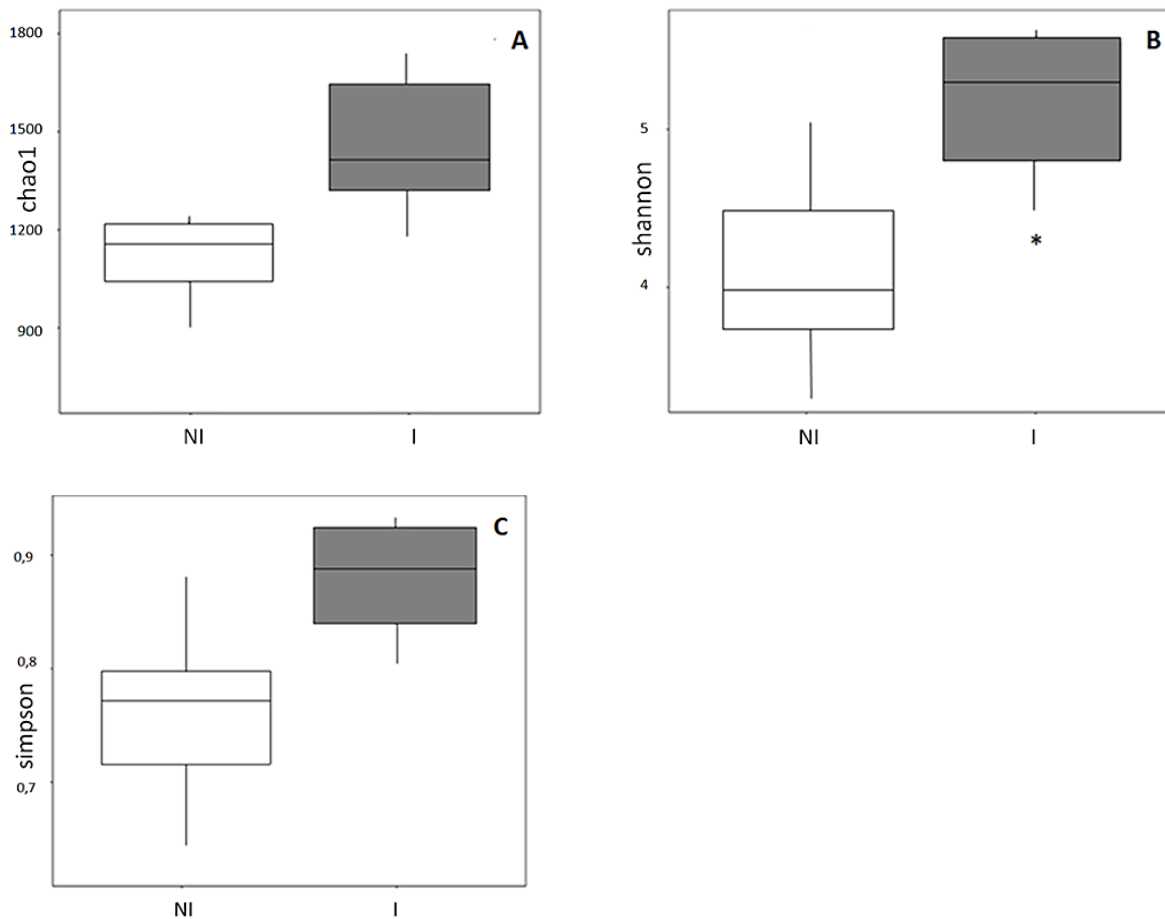


Figura 23. Métricas de diversidad alfa. Índice Chao1 (chao1) (A), índice de Shannon-Wiener (Shannon) (B), e índice inverso de Simpson (Simpson) (C) en la microbiota del moco de la piel de lubinas (*Dicentrarchus labrax*) no infectadas (NI) e infectadas (I). Los diferentes índices se han representado en diagramas de Box-Whisker y las diferencias significativas están indicadas con un asterisco.

5.3.2. Diversidad beta

La diversidad beta de los peces NI e I fue estudiada mediante el uso de escala multidimensional no métrica (NMDS) (**Fig. 24**). Las muestras pertenecientes a lubinas NI e I se dividieron y agruparon en dos grupos según las OTUs detectadas (Valor de tensión 0,070). El análisis de similitud (Anosim) mostró que había diferencias significativas entre las comunidades microbianas pertenecientes a los dos grupos experimentales (Valor-R 0,5215, $p = 0,002$). Sin embargo, el patrón de microbiota de una de las muestras del grupo NI (NI 1) se asoció con el patrón del grupo I.

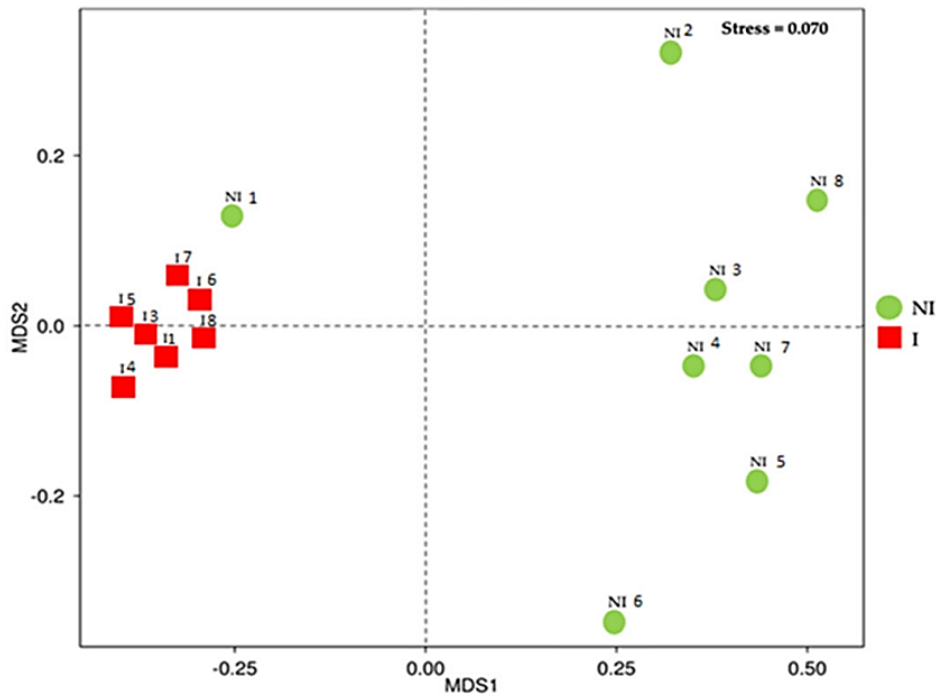


Figura 24. Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) en la microbiota del moco de la piel de lubinas (*Dicentrarchus labrax*) no infectadas (rojo) e infectadas (verde).

5.3.3. Taxonomía

La composición taxonómica mostró Proteobacterias, Verrucomicrobia, Patescibacterias, Bacteriodetes, Firmicutes, Epsilonbacteraeota y Actinobacterias como filos dominantes (abundancia relativa > 1%) (**Fig. 25**). Con respecto al moco de la piel de peces NI, Verrucomicrobia fue el filo dominante (48,36%), seguido de Proteobacterias (44,34%), Bacteroidetes (2,17%), Actinobacterias (0,91%), Patescibacterias (0,85%), Firmicutes (0,72%) y Epsilonbacteraeota (0,21%). Por el contrario, Proteobacterias mostró la mayor abundancia relativa en la microbiota de peces I (61,22%), seguido de Verrucomicrobia (25,20%), Patescibacterias (3,82%), Bacteroidetes (2,93%), Epsilonbacteraeota (1,90%), Firmicutes (1,88%) y Actinobacterias (1,18%).

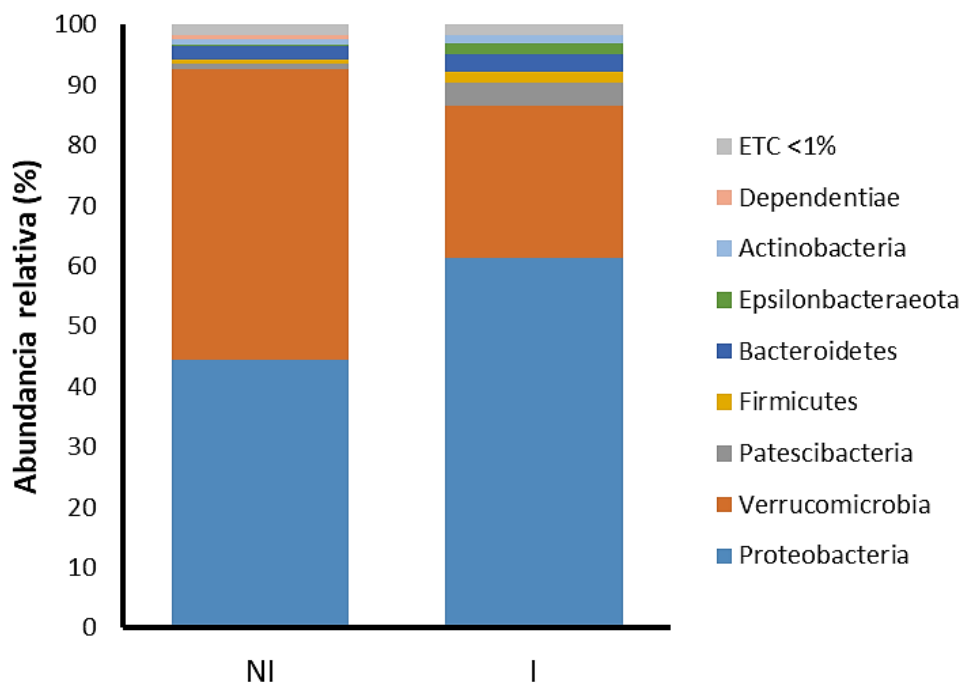


Figura 25. Abundancia relativa (%) de bacterias a nivel de filo en el moco de la piel de lubinas (*Dicentrarchus labrax*) no infectadas (NI) e infectadas (I). ETC: abundancia relativa < 1%.

A nivel de clase, 7 de ellas mostraron porcentajes de abundancia relativa superiores al 1%: Gammaproteobacterias, Verrucomicrobiae, Alphaproteobacterias, Gracilibacterias, Bacteroidias, Campylobacterias y Bacilli (**Fig. 26**). Verrucomicrobiae (48,36%) seguido de Gammaproteobacterias (24,32%), Alphaproteobacterias (18,98%), Bacteroidias (2,15%), Gracilibacterias (0,79%), Campylobacterias (0,22%) y Bacilli (0,21%) se detectaron en la microbiota de peces NI. Sin embargo, se observó la abundancia de Gammaproteobacterias (40,97%) seguido de Verrucomicrobiae (25,20%), Alphaproteobacterias (19,41%), Gracilibacterias (3,77%), Bacteroidias (2,88%), Campylobacterias (1,90%) y Bacilli (1,60%) se observaron en la microbiota de los peces I.

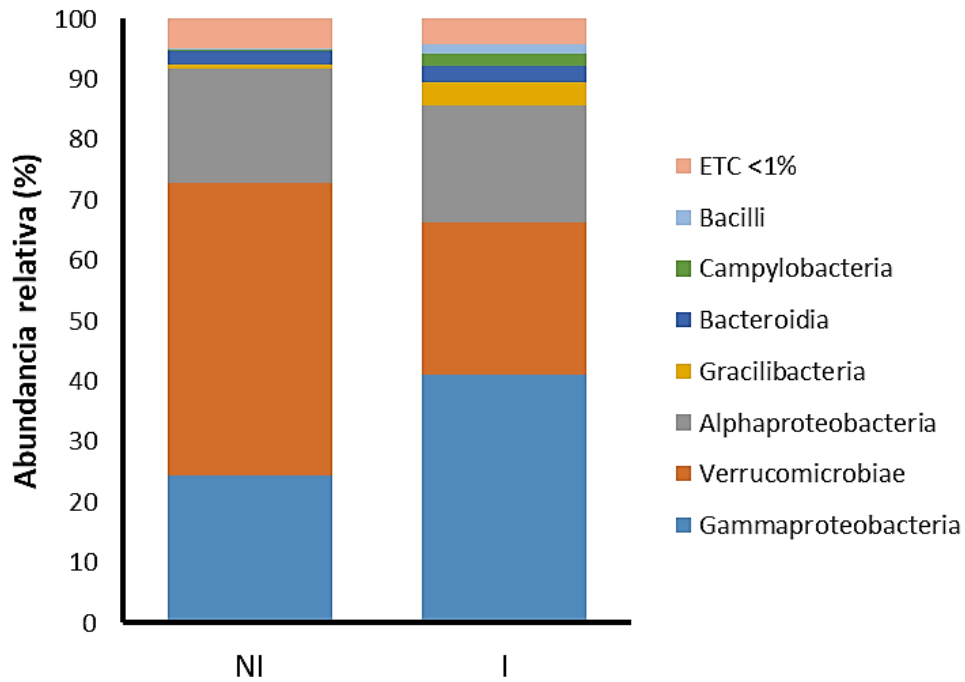


Figura 26. Abundancia relativa (%) de bacterias a nivel de clase en el moco de la piel de lubinas (*Dicentrarchus labrax*) no infectados (NI) e infectados (I). ETC: abundancia relativa < 1%.

Cuando la microbiota fue considerada a nivel de género, *Vibrio*, *Rubritalea*, *Acinetobacter*, *Marivita*, *Arcobacter*, *Persicirhabdus*, *Ruegeria*, *Photobacterium*, *Oceaniserpentilla* y *Pseudomonas* se detectaron con porcentajes de abundancia relativos >1%.. Aunque con diferentes porcentajes dependiendo del estado de salud, los géneros más abundantes correspondieron a *Rubritalea* (47,47% y 23,96%, NI/I, respectivamente), *Acinetobacter* (11,48% y 8,35% NI/I, respectivamente) y *Vibrio* (3,84% y 19,92%, NI/I, respectivamente). Sin embargo, los ejemplares NI mostraron valores de abundancia del género *Rubritalea* superiores a los valores encontrados en peces I. Además, los géneros que muestran porcentajes de abundancia por debajo del 1% siempre representaron alrededor del 30% de las abundancias totales, independientemente del estado de salud de los especímenes (Fig. 27).

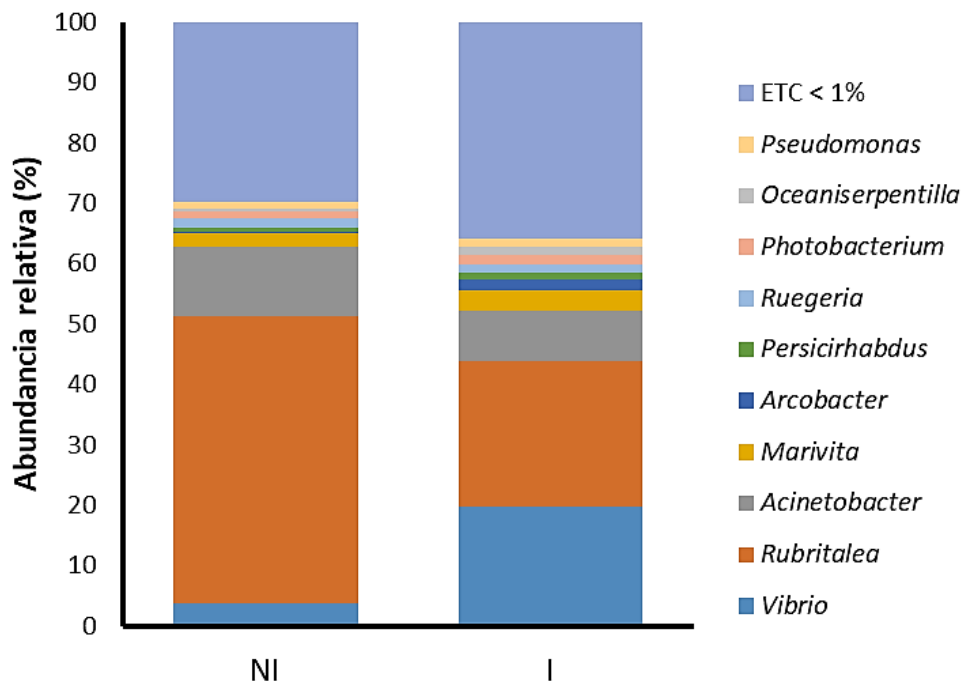


Figura 27. Abundancia relativa (%) de bacterias a nivel de género en el moco de la piel de lubinas (*Dicentrarchus labrax*) no infectadas (NI) e infectadas (I). ETC: abundancia relativa < 1%.

Por último, se utilizó el análisis LEfSe para detectar biomarcadores. Los análisis de LEfSe determinaron el taxón que es más probable que explique las diferencias entre el moco de los peces no infectados e infectados. Las especies ordenadas por la puntuación ADL fueron principalmente Proteobacterias (*V. harveyi*) para el grupo I mientras que Verrucomicrobia (específicamente el género *Rubritalea*) se asoció especialmente con el grupo NI (Fig. 28).

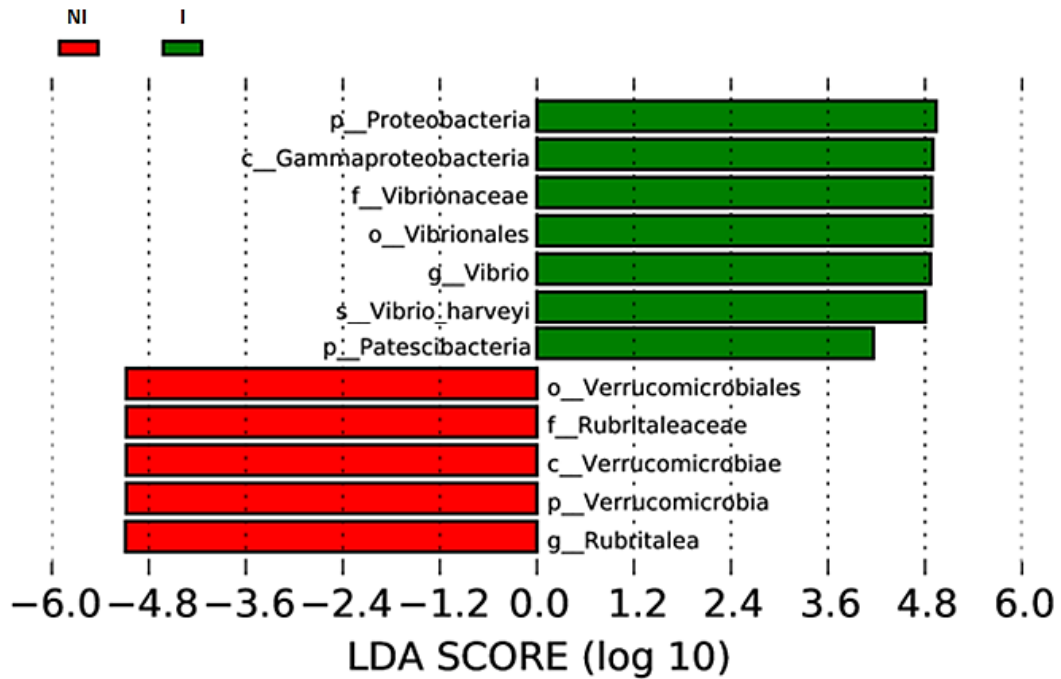


Figura 28. Análisis discriminante lineal (ADL) del efecto del tamaño (LEfSe) de la microbiota de moco de la piel de lubinas (*Dicentrarchus labrax*) no infectadas (NI) e infectadas (I) con *Vibrio harveyi*. Las puntuaciones de ADL indican los taxones más abundantes en los dos grupos experimentales. La de los peces infectados se muestra en verde mientras que la de los no infectados se muestra en rojo. Los prefijos representan abreviaturas para el rango taxonómico de cada taxón: filo (p_), clase (c_), orden (o_), familia (f_), género (g_) y especie (s_).

Capítulo 3:

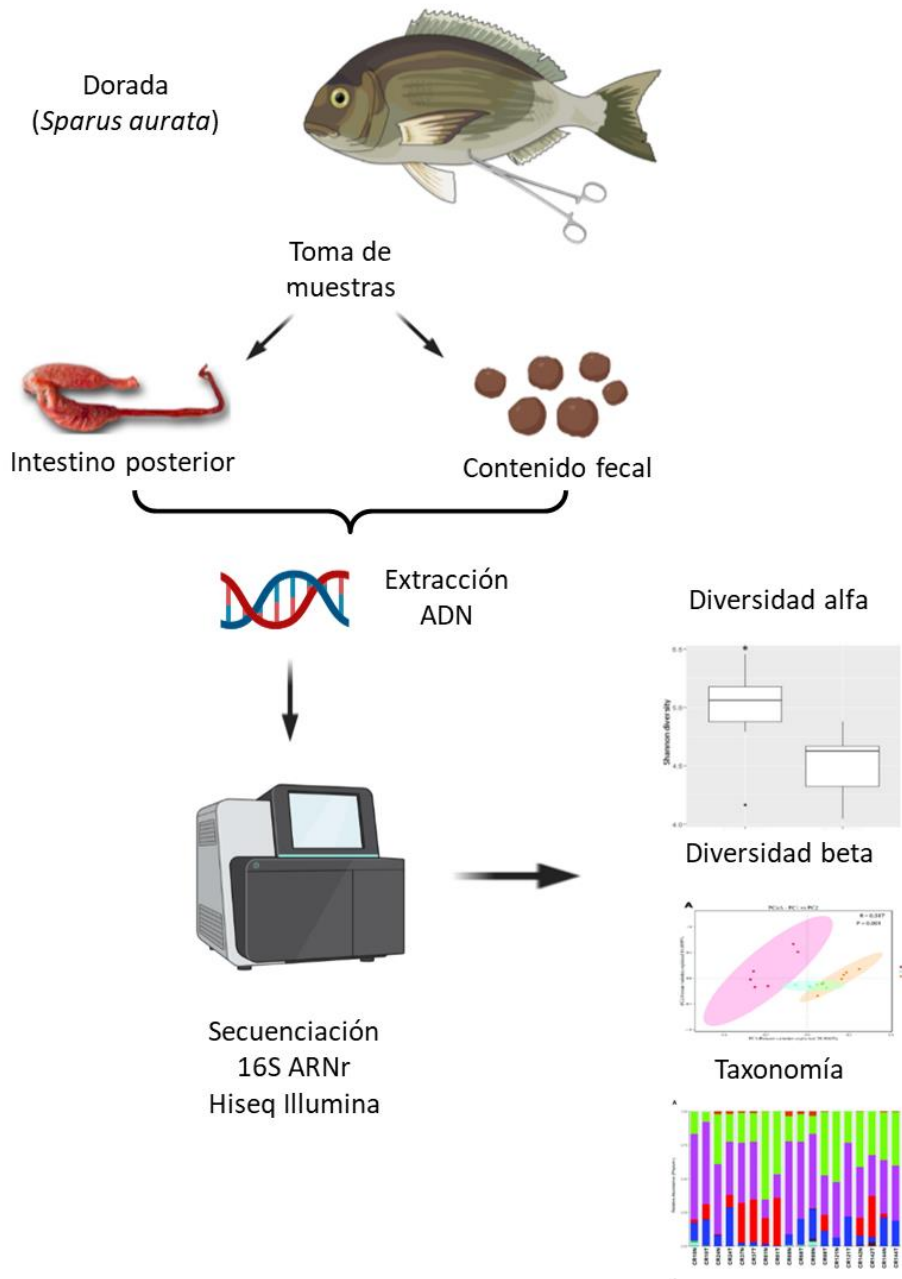
Microbiota asociada al hospedador en el tracto gastrointestinal y en las heces de la dorada (*Sparus aurata*).

| | Pág. |
|-------------------------|------|
| 1. Resumen | 82 |
| 2. Resumen gráfico | 83 |
| 3. Introducción | 84 |
| 4. Materiales y métodos | 86 |
| 5. Resultados | 89 |

1. Resumen

La microbiota intestinal juega un papel clave en la salud animal, incluida la protección contra enfermedades infecciosas, el mantenimiento óptimo del estado inmunológico y la homeostasis metabólica del huésped. En este capítulo, el intestino posterior y el contenido fecal de la dorada se caracterizaron y compararon utilizando secuenciación de nueva generación (NGS) Ion Torrent PGM. Los resultados obtenidos mostraron que Proteobacteria fue el filo más abundante seguido de Cyanobacteria, Firmicutes, Spirochaetes y Fusobacteria. No se observaron diferencias significativas en las métricas de diversidad alfa y beta. El biomarcador detectado para la comunidad microbiana del intestino posterior fue el género *Bacteroides*, mientras que en el contenido fecal se encontró *Tropicibacter* como principal biomarcador. La recolección de contenido fecal como método no invasivo podría ser una opción viable para estudiar la comunidad microbiana del intestino posterior de los peces.

2. Resumen gráfico



3. Introducción

La microbiota se puede definir como la comunidad de microorganismos que ocupan un entorno particular (Butt y Volkoff, 2019). Estas comunidades microbianas incluyen organismos comensales, simbióticos y patógenos que contienen virus, protozoos, levaduras, arqueas y bacterias. En los peces teleósteos, estas comunidades se encuentran en el epitelio de las mucosas, como los de la piel, las branquias y el tracto GI (Merrifield y Rodiles, 2015). La mayoría de los estudios sobre la microbiota de los peces teleósteos se han centrado en las comunidades microbianas asociadas a estas mucosas, especialmente en la microbiota GI, ya que desempeña un papel clave en la modulación de varias funciones, como son la homeostasis energética, la respuesta inmunitaria e incluso el comportamiento (Davidson y col., 2017; Johnson y Foster, 2018; Silva y col., 2011).

Dentro de las funciones asociadas a la microbiota gastrointestinal de los peces se encuentra la digestión (Nayak, 2010). El intestino es el principal órgano donde ocurre la digestión/absorción de nutrientes. Además de la digestión, el intestino juega un papel crucial en el balance osmótico, en la regulación endocrina y en la inmunidad (Ringø y col., 2003). Histológicamente, el intestino de los peces contiene un epitelio absorbente columnar simple y la porción apical de estas células se encuentra revestida de microvellosidades (De Silva y Anderson 1995). Entre los enterocitos se intercalan células caliciformes (células productoras de moco). El número de células caliciformes es mayor en la región posterior del intestino que en las regiones anterior y media (Ray y Moitra, 1982). Cabe mencionar que la parte posterior del intestino se considera el sitio principal para la absorción de macromoléculas (Dalmo y col., 1997).

Entre los aspectos más importantes en relación con el estudio de las comunidades microbianas del tracto GI de peces, se encuentra caracterizar su diversidad estructural, definiendo claramente los miembros residentes y los transitorios (Kormas y col., 2014). Se sabe que, en vertebrados y también en peces, los microbios en el tracto gastrointestinal se pueden clasificar en dos grupos, dependiendo tanto de su ubicación como de su residencia. Un grupo se está formando por la microbiota alóctona, que pasa a través de la luz junto con los alimentos y se considera transitoria. Mientras que otro grupo corresponde a la microbiota autóctona y se consideran comunidades potencialmente residentes (Ringø y col., 2006).

Las especies bacterianas que se consideran residentes o autóctonas son capaces de adherirse y colonizar la superficie epitelial intestinal, mientras que las transitorias o alóctonas se consideran visitantes ocasionales, principalmente asociadas con el proceso de digestión, en el tracto gastrointestinal, y son rechazadas después de algún tiempo sin llegar a poder colonizar dicha mucosa (Ringø y col., 2007). Con respecto a su funcionalidad, las bacterias autóctonas se consideran más importantes que las alóctonas, ya que proporcionan al huésped apoyo nutricional y participan en la prevención de enfermedades. Estas comunidades están involucradas en la producción y almacenamiento de energía y llevan a cabo funciones como la fermentación y absorción de carbohidratos no digeridos, la eliminación de productos de desecho y la producción de enzimas extracelulares, aminoácidos y vitaminas (Teixeira-de Mello y col., 2012). También bloquean físicamente el sitio de unión de los patógenos y secretan una amplia gama de bacteriocinas (Kim y col., 2007; Merrifield y col., 2011; Ringø y col., 2003).

La mayoría de los estudios disponibles sobre la microbiota intestinal de los peces se centran principalmente en la acción de probióticos y prebióticos e implican el sacrificio y la disección del animal (Estruch y col., 2015; Fontinha y col., 2021). Este capítulo se centró en la posibilidad de extrapolar la microbiota gastrointestinal de un organismo a partir del estudio de la comunidad microbiana de sus heces. La finalidad es monitorear estado de la microbiota de los peces en un sistema de cultivo a través del conocimiento de la composición de su microbiota intestinal sin necesidad de tomar muestras invasivas y sin sacrificar animales. Para ello el objetivo fue caracterizar y comparar las comunidades bacterianas del tracto gastrointestinal autóctonas (intestino posterior) y alóctona (contenido fecal) en dorada (*S. aurata*), utilizando la tecnología NGS de Ion Torrent PGM.

4. Materiales y métodos

4.1. Animales

Se emplearon 40 ejemplares de dorada obtenidos de una granja local (Murcia, España) con un peso medio de $90,3 \pm 9,6$ g y una longitud total de $17,9 \pm 1,1$ cm. Los peces se distribuyeron aleatoriamente en 4 acuarios con circuito cerrado (400 L), aireación continua y un flujo de agua de 900 L h^{-1} a 20 ± 2 °C y 30 ‰ de salinidad. Los peces fueron aclimatados durante 1 mes y se alimentaron con una dieta comercial (Skretting) a una tasa del 2% del peso corporal por día. Después de la aclimatación, se seleccionaron al azar 4 especímenes (2 especímenes de cada tanque).

4.2. Toma de muestras

Antes de la toma de muestras, los peces fueron anestesiados usando $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de aceite de clavo (Guinama®). Una vez sedados, todos los peces fueron pesados, medidos y sacrificados, tras limpiar la superficie externa de cada pez con etanol al 70% para evitar la posible contaminación con la microbiota de la superficie corporal externa durante la disección. Con la ayuda de tijeras y fórceps estériles, el intestino posterior (excluyendo el área pilórica) se diseccionó asépticamente. Las heces se obtuvieron presionando ligeramente y arrastrando, con una espátula estéril, el contenido intestinal con cuidado de no arrastrar la mucosa adherida al intestino con la finalidad de estudiar la microbiota alóctona. Estas mismas muestras de intestino posterior fueron utilizadas para estudiar la microbiota autóctona. Tanto las muestras de heces (H) como de intestino posterior (IP) se colocaron en tubos estériles y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para después ser almacenados a -80 °C.

4.3. Análisis de la microbiota

Las muestras (n=8) se homogeneizaron utilizando un homogeneizador TissueLyser LT (Qiagen, UK) durante 3 min a 45 Hz. El ADN genómico total se extrajo del intestino posterior y de las heces con el AS1600 Maxwell(R) *RSC PureFood GMO and Authentication Kit* (Maxwell AS3000, Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se cuantificó mediante espectrofotometría en el equipo Nanoquant (Infinite M200 Pro Nanoquant, TECAN, Austria).

La diversidad microbiana se analizó con el “Ion Metagenomics 16S Kit” (Ion Torrent), que incluye los cebadores para amplificar las regiones variables 2, 4 y 8 en un solo tubo, con amplicones resultantes de 250 pares de bases (pb), 288 pb y 295 pb, respectivamente. En un segundo tubo, una reacción PCR multiplex dirigida a las regiones variables 3, 6-7 y 9 con fragmentos resultantes de 215 pb, 260 pb y 209 pb, respectivamente. Los cebadores fueron diseñados para capturar > el 80% de las secuencias encontradas en la base de datos Greengenes con una identidad del 100%.

La preparación del cebador de 400 pb se realizó utilizando el sistema Ion OneTouch™ 2 y con el kit *Ion PGM™ Hi-Q view OT2* (Ion Torrent). La secuenciación se realizó utilizando el kit *Ion PGM™ Hi-Q view Sequencing* (Ion Torrent) en el sistema *Ion PGM™* utilizando un chip 318. El análisis primario de los datos se realizó con *Torrent Suite™* Software v5.12.0 y el análisis avanzado con el software *Ion Reporter™* v5.12.2.0. Se generaron valores de abundancia de cada muestra para cada taxón identificado con una identidad mayor al 97% y de 99% para cada especie. Las curvas de rarefacción se obtuvieron directamente del programa *Ion Reporter*. Por otro lado, los resultados brutos obtenidos fueron exportados para su posterior tratamiento y análisis con el software R.

4.4. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente considerando los dos grupos IP y H en los diferentes niveles taxonómicos (filo, clase, orden, familia, género, especie) utilizando el paquete DESeq2. La diversidad alfa se estimó utilizando los índices Chao1, Shannon e Inverso-Simpson utilizando el paquete *phyloseq* (McMurdie y Holmes, 2013). Para determinar las diferencias estadísticamente significativas se utilizó la prueba t student. La diversidad beta y el análisis NMDS se obtuvieron con el paquete *vegan* (Dixon, 2003). El análisis de similitud se llevó a cabo utilizando la prueba de Anosim del paquete *vegan*. Finalmente, el análisis LEfSe se realizó en la plataforma Galaxy del servidor Galaxy del laboratorio Huttenhower (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) con alfa 0,1 para las pruebas de Kruskal-Wallis y Wilcoxon y umbral 2.0 para la puntuación ADL.

5. Resultados

5.1. Diversidad y composición de la microbiota

Para las 8 muestras analizadas, se obtuvieron un total de 1.250.719 lecturas de alta calidad, correspondientes a $156.339,9 \pm 71.134,5$ de media por muestra (mínimo de 67.753 y máximo de 271.626). En cuanto a los grupos, $109.201 \pm 39.617,2$ lecturas medias correspondieron a las muestras de IP, $203.478,75 \pm 65.665,1$ lecturas medias correspondientes a las muestras de las H. Las gráficas de rarefacción realizan el cálculo de las especies observadas con respecto al número de secuencias obtenidas, identificando la riqueza de las comunidades microbianas por muestra. Todas las curvas trazadas fueron asintóticas, lo que indica que no fue necesaria una mayor profundidad de muestreo para encontrar un mayor número de especies en la muestra (**Fig. 29**). En cuanto al análisis taxonómico, se calculó la abundancia relativa de cada OTU por muestra dividiendo el número de lecturas de cada taxón con respecto a las lecturas totales por muestra para la normalización de datos.

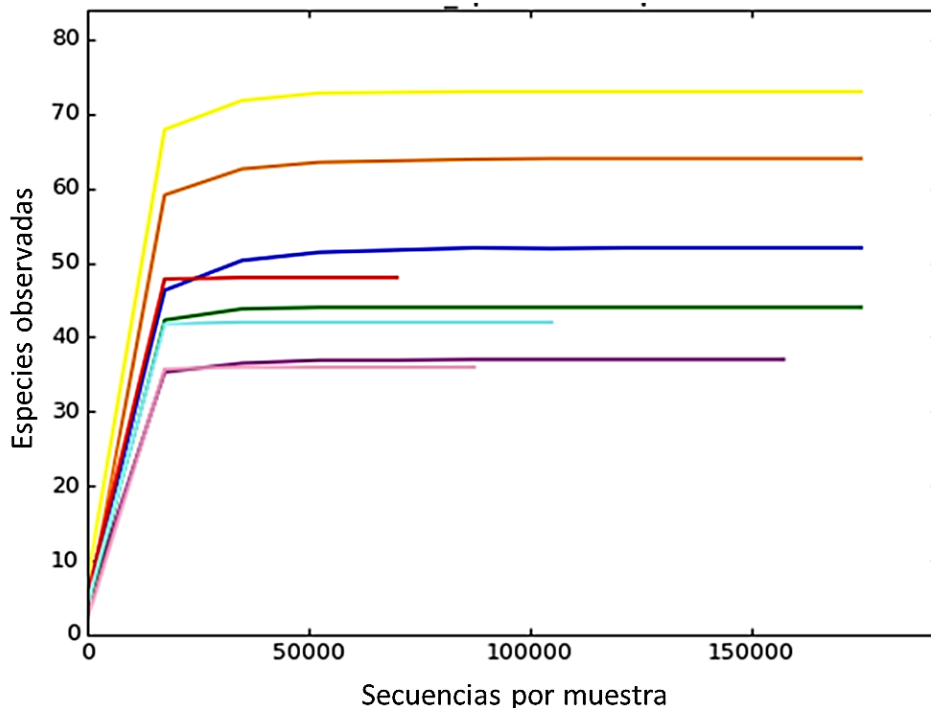


Figura 29. Curvas de rarefacción obtenidas a partir de datos de secuenciación de las diferentes muestras de intestino posterior (IP) y heces (H) de dorada (*Sparus aurata*).

5.2. Índices de diversidad

La diversidad y la riqueza de las poblaciones bacterianas del IP y las H se estudiaron a través de métricas de diversidad alfa (índices Chao1, Shannon e inverso-Simpson). No se observaron diferencias significativas en ninguno de los índices estudiados entre muestras de IP y de H (**Fig. 30**).

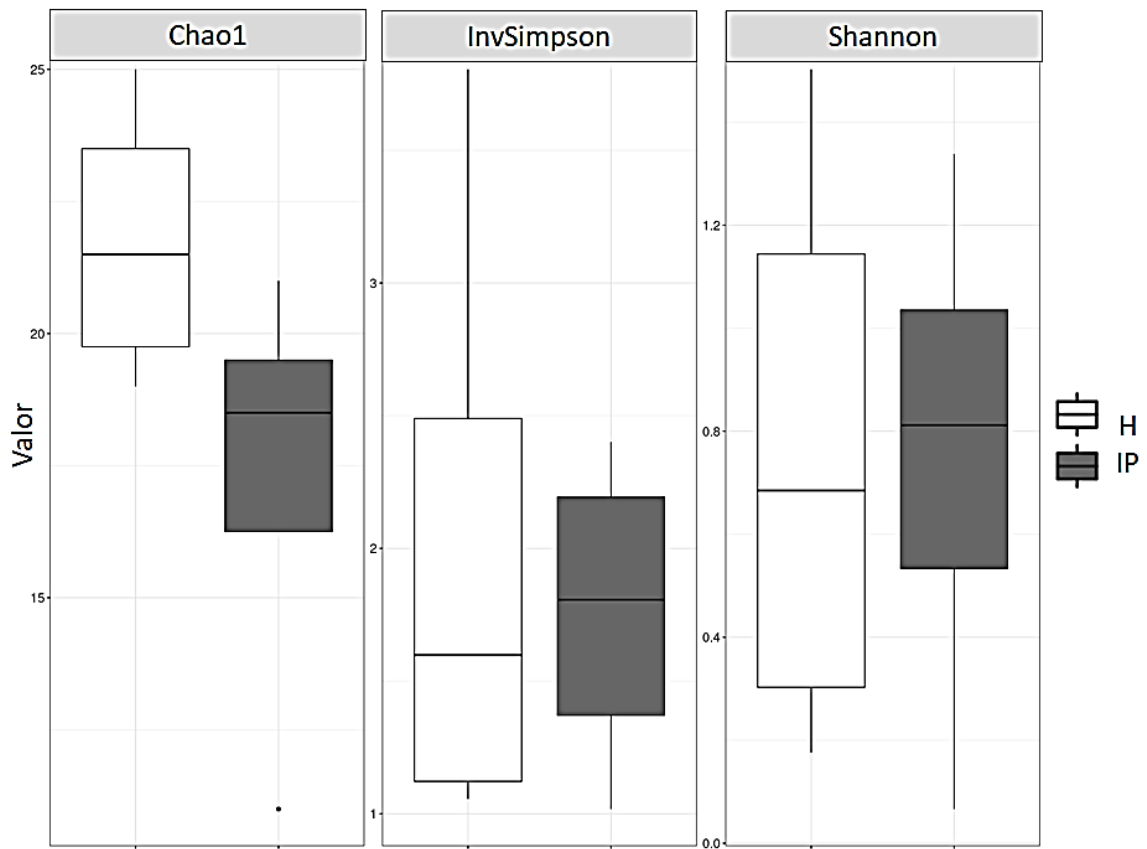


Figura 30. Métricas de diversidad alfa (chao1, Shannon, InvSimpson) en el intestino posterior (IP) y en las heces (H) de dorada (*Sparus aurata*). Los diferentes índices están representados por cajas de Box-Whisker.

La diversidad beta del IP y de H también se determinó y estudió mediante el análisis NMDS. El análisis de similitud (Anosim) mostró que no existían diferencias significativas entre las comunidades microbianas entre los grupos IP y H en ninguno de los niveles taxonómicos estudiados ($p = 0,219$, $R = 0,104$) (**Fig. 31**).

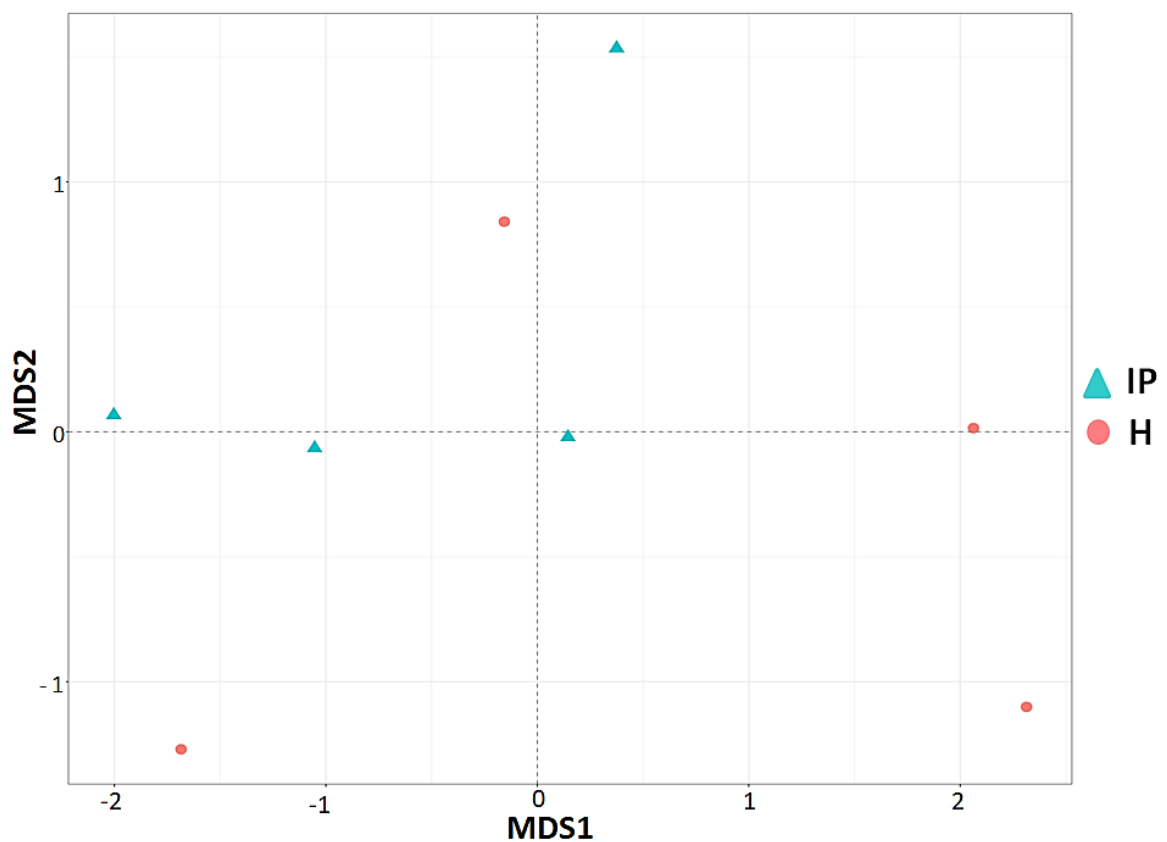


Figura 31. Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) en el intestino posterior (IP) y en las heces (H) de dorada (*Sparus aurata*).

5.3. Taxonomía

La composición taxonómica de la microbiota de dorada encontrada en el IP y en H a nivel de filo mostró como filos dominantes a Proteobacterias, Fusobacterias, Firmicutes, Cianobacteria y Spirochaetes (abundancia relativa > 1%). Con respecto a la composición microbiana del IP, Proteobacteria fue el filo dominante (64,4%), seguido de Cianobacterias (16,1%), Espiroquetas (10,9%), Firmicutes (6,5%) y Fusobacteria (1,62%). Por otro lado, Proteobacteria también mostró la mayor abundancia relativa en la microbiota en H (71,4%), seguida de Firmicutes (14,2%), Cianobacterias (6,93%) y Fusobacteria (6,38%) (**Fig. 32A**).

A nivel de clase, 7 clases mostraron porcentajes de abundancia relativa superiores al 1% en todas las muestras: γ -Proteobacteria, Nostocophycideae, Clostridia, Spirochaetia, Fusobacteriia, Bacilli y α -Proteobacteria. γ -Proteobacterias (62,1%) seguidas de Nostocophycideae (15,4%), Spirochaetia (10,9%), Clostridia (4,95%), α -Proteobacteria (2,24%), Fusobacteriia (1,61%) y Bacilli (1,35%) se detectaron en la microbiota del IP. En cuanto a la composición microbiana de las H se observó abundancia de γ -Proteobacterias (69,5%), seguida de Clostridia (10,1%), Fusobacteriia (6,38%), Nostocophycideae (6,01%), Bacilos (3,89%) y α -Proteobacteria (1,83%) (**Fig. 32B**).

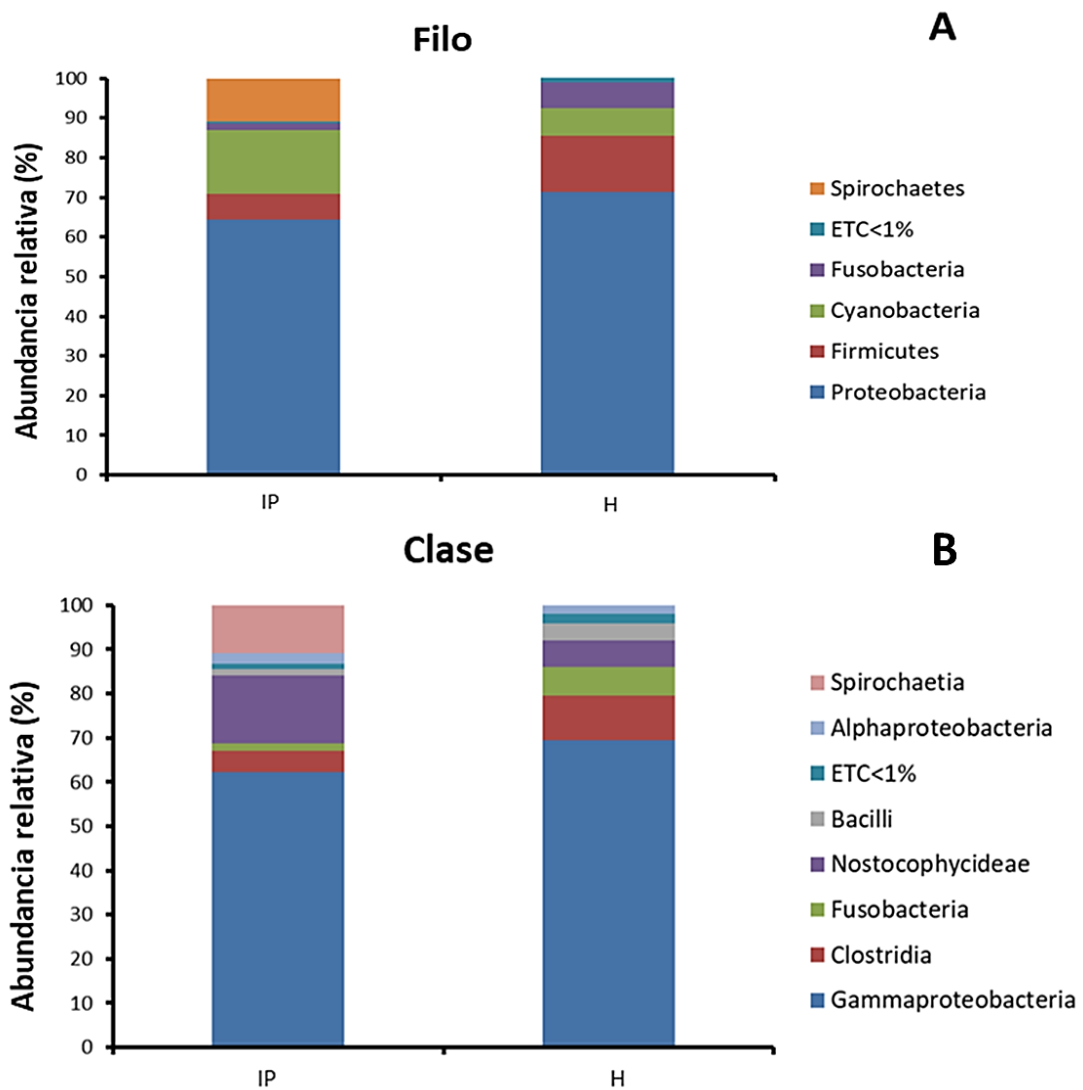


Figura 32. Abundancia relativa (%) de bacterias a nivel de filo (A) y clase (B) identificadas en el intestino posterior (IP) y en las heces (H) de dorada (*Sparus aurata*). ETC: abundancia relativa < 1% en promedio.

A nivel de familia, se encontró que 7 familias tenían porcentajes de abundancia relativa superiores al 1% en todas las muestras: Vibrionaceae, Nostocaceae, Brevinemataceae, Clostridiaceae, Fusobacteriaceae, Rhodobacteraceae y Lactibacillaceae. En el IP, la familia más abundante correspondió a Vibrionaceae (61,8%) seguida de Nostocaceae (15,4%), Brevinemataceae (10,9%), Clostridiaceae (4,93%), Rhodobacteraceae (2,24%) y Fusobacteriaceae (1,62%). Con respecto a las H, los porcentajes de abundancia relativa, la familia más abundante observada fue Vibrionaceae (68%) seguida de Clostridiaceae (10,1%), Fusobacteriaceae (6,38%), Nostocaceae (6,01%), Lactibacillaceae (3,37%) y Rhodobacteraceae (1,80%) (**Fig. 33A**).

Cuando se consideró a nivel de género, se detectaron *Photobacterium*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Cetobacterium* y *Lactobacillus* con porcentajes de abundancia relativa >1%. En el IP, los géneros más abundantes correspondieron a *Photobacterium* (69,9%), seguido de *Vibrio* (17,1%), *Clostridium* (10,2%), *Cetobacterium* (2,18%) y *Lactobacillus* (1,37%). Por otro lado, se observaron valores de abundancia de *Photobacterium* (67,4%), seguidos de *Clostridium* (12,3%), *Cetobacterium* (7,19%), *Vibrio* (5,52%) y *Lactobacillus* (3,84%) en las H (**Fig. 33B**).

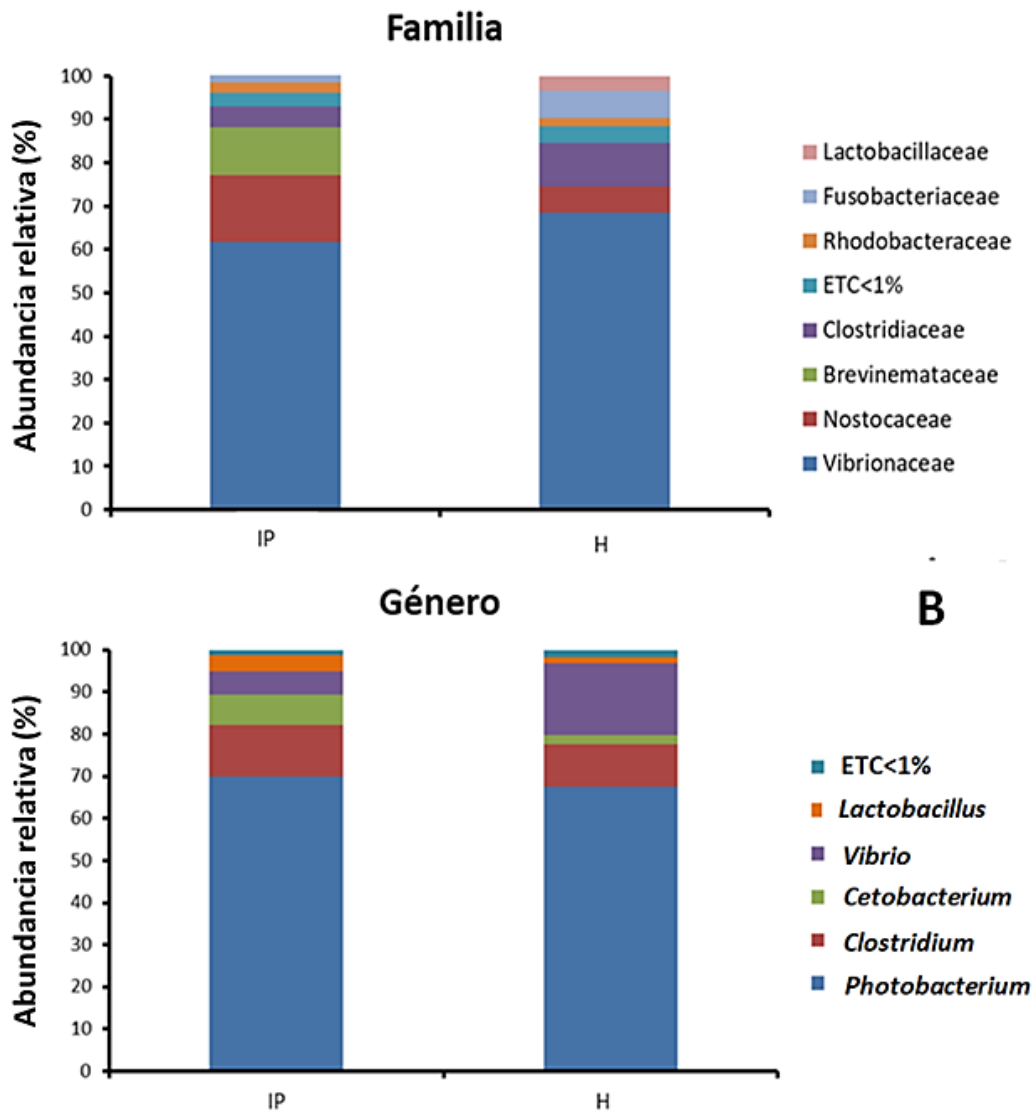


Figura 33. Abundancia relativa (%) de bacterias a nivel de familia (A) y género (B) identificadas en el intestino posterior (IP) y en las heces (H) de dorada (*Sparus aurata*). ETC: abundancia relativa < 1% en promedio.

Por último, se utilizó LEfSe para detectar OTUs significativamente distintos y los análisis determinaron los taxones que tienen más probabilidades de explicar las diferencias entre el IP y las H. Curiosamente, no se encontraron diferencias a nivel de filo, clase o familia. El género clasificado por puntuación ADL fue *Bacteroides* para IP, mientras que *Tropicibacter* se atribuyó a H (Fig. 34).

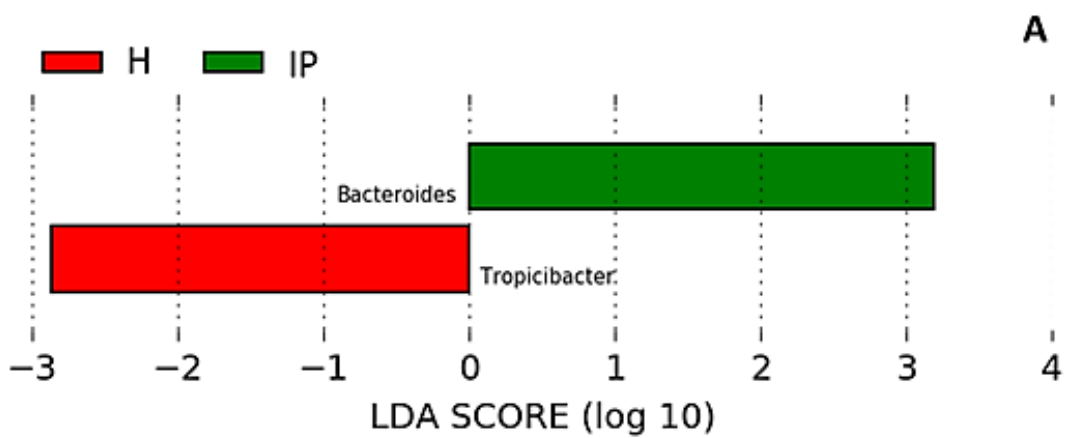


Figura 34. Análisis discriminante lineal (ADL) del efecto del tamaño (LEfSe) de la microbiota del intestino posterior (IP) y de las heces (H) de dorada (*Sparus aurata*). Las puntuaciones de ADL para taxones diferencialmente abundantes en la microbiota de IP se muestran en verde y mientras que para las H se muestran en rojo.

Discusión general

La presente Tesis Doctoral pretende avanzar en el conocimiento dentro del amplio campo de estudio de la composición de las comunidades bacterianas de peces con interés acuícola, en concreto de la dorada y la lubina por ser dos especies de gran interés económico tanto en el Mediterráneo como en el arco sur Atlántico de la península Ibérica, en la Macaronesia y en la costa noroeste de África. Durante el desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral se han replicado dos situaciones desfavorables para la salud de los peces en cultivo; por un lado, las situaciones de estrés y, por otro lado, las infecciones bacterianas.

Finalmente se estableció una metodología de comparación entre diferentes formas de muestreo de la microbiota intestinal (de más a menos invasiva) con la finalidad de mejorar el bienestar de los animales de experimentación y con aplicabilidad directa al sector productivo, por lo que a través de esta metodología el productor no necesitaría realizar un sacrificio de los animales cada vez que estuviera interesado en tomar muestras y/o analizar la microbiota de los animales.

El estrés en la piscicultura

Los agentes estresantes producen efectos que amenazan o perturban el equilibrio homeostático de los peces y provocan un conjunto coordinado de respuestas conductuales y fisiológicas compensatorias y/o adaptativas, que permiten al animal superar la situación de estrés (Wendeelar Bonga, 1997). Sin embargo, si un animal experimenta estrés crónico intenso, dicha respuesta al estrés pierde su valor adaptativo y se vuelve disfuncional, lo que puede resultar en inhibición del crecimiento, deterioro reproductivo, reducción de la resistencia a patógenos e incluso la muerte (Wendeelar Bonga, 1997). En el **capítulo 1** evaluamos los efectos *in vivo* del estrés crónico causado por la hipoxia, teniendo en cuenta que la exposición al aire es un factor estresante común en la acuicultura, ya que los procedimientos de manejo durante el ciclo de cría y producción de animales requieren exponer a los peces a ambientes aéreos (captura, manejo, transporte) (Bayunova y col., 2002).

Discusión general

En este estudio se evaluaron las tres etapas de la respuesta al estrés, así como el estado inmunológico y la composición microbiana del moco de la piel comparando peces no estresados con peces sometidos a estrés crónico a lo largo del tiempo.

Los niveles de cortisol se han medido tradicionalmente en sangre como un indicador principal de respuesta al estrés en los peces. Además, se ha demostrado que los niveles de cortisol en el moco de la piel reflejan fielmente las respuestas de estrés agudo en peces expuestos a estrés de transporte o hipoxia y se correlacionan positivamente con los niveles de cortisol en sangre (Bertotto y col., 2010; De Mercado y col., 2018; Guardiola y col., 2016). En este estudio, se evaluó el patrón temporal de secreción de cortisol en suero y en moco de la piel durante un episodio de estrés crónico. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de cortisol sérico entre los grupos C y S ni en los tiempos experimentales por separado (0, 14, 28 días) ni en el conjunto global de los tres tiempos experimentales. En otros estudios, después de 14 o 30 días en condiciones estresantes (confinamiento), los niveles de cortisol en suero y en moco de la piel de la trucha arco iris (*O. mykiss*) disminuyeron a lo largo del tiempo en el grupo estresado hasta el punto que los niveles de cortisol no difirieron de los del grupo control (Carbajal y col., 2018). En otro estudio que midió los niveles de cortisol en plasma después de un estrés prolongado (15 s fuera del agua, cada día, durante 4 semanas), se demostró que después de 3 y 4 semanas, los niveles de cortisol en eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*) también disminuyeron con el tiempo en peces estresados a niveles que no fueron estadísticamente significativos en comparación con los del grupo control (Hosoya y col., 2007). En esta Tesis Doctoral, en cuanto a los niveles de cortisol en moco de la piel, se observaron diferencias significativas a nivel global. En particular, se observó un descenso en las dos primeras semanas de experimento mientras que se detectó un aumento en las dos semanas posteriores. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre grupos C y S en los diferentes tiempos experimentales de manera similar a los resultados obtenidos en el cortisol sérico. Teniendo en cuenta estos resultados, los niveles de glucocorticoides en el suero y en el moco de la piel parecen proporcionar sólo una instantánea del estado del cortisol en el momento del muestreo y no se correlacionan con la exposición prolongada de los peces al estrés en este caso (Romano y col., 2010). Además, estudios previos han sugerido que la dorada tiene una capacidad particularmente alta para manejar el estrés (Samaras y col., 2018).

Con respecto a las respuestas secundarias al estrés, el estudio de factores hematológicos y químicos sanguíneos como son la glucosa y el lactato se ha utilizado ampliamente en diversos estudios (Wells y Pankhurst, 1999). Los niveles de glucosa en suero se elevan durante el estrés en los peces debido a los niveles elevados de catecolaminas en sangre (Pottinger, 1998). Además, se producen niveles elevados de lactato en sangre como consecuencia de la actividad respiratoria en condiciones anaeróbicas en las que las reservas de glucógeno se agotan y el lactato se acumula en el tejido muscular (Milligan y Girard, 1993). En nuestro estudio, se observó un descenso en las primeras dos semanas y un posterior aumento en las dos últimas semanas de experimento en la glucosa y el lactato sérico de manera global. Además, se observó una interacción del grupo experimental y el tiempo para el lactato sérico. No obstante, no se observaron diferencias significativas en la glucosa y el lactato sérico entre los grupos C y S. Por otra parte, no se detectaron diferencias significativas en cuanto a los niveles de glucosa y lactato en el moco de la piel ni en los tiempos experimentales por separado (0, 14, 28 días) ni en el conjunto global de los tres tiempos experimentales. Está bien establecido que después de un factor estresante agudo, los niveles de marcadores de estrés circulantes, como el cortisol, aumentan en los primeros minutos u horas de respuesta al estrés, pero vuelven a los niveles basales con el tiempo, generalmente en 24 h. Al igual que el cortisol, los niveles circulantes de glucosa y lactato también vuelven a los niveles basales horas después del estrés, lo que hace que estos metabolitos sean marcadores poco fiables en el caso de factores estresantes crónicos (Raposo De Magalhães y col., 2020). Teniendo en cuenta estos resultados, se puede considerar que los niveles de cortisol, glucosa y lactato en suero y en moco de la piel, no son buenos indicadores para el seguimiento del estrés crónico en la dorada y otras matrices deberían explorarse y validarse en estudios futuros. De hecho, se ha informado en varios estudios que las escamas podrían ser una matriz potencial para estudiar el estrés crónico en peces (Carbajal y col., 2018).

Las respuestas terciarias al estrés se refieren a aspectos del rendimiento del animal, como cambios en el crecimiento, la condición, la resistencia general a las enfermedades y, en última instancia, la supervivencia (Barton, 2002). En nuestro estudio, los peces del grupo S sufrieron un efecto perjudicial en el rendimiento del crecimiento en comparación con los peces del grupo C. Este resultado concuerda con los anteriores en los que también se observó deterioro del crecimiento como consecuencia del estrés

Discusión general

crónico (Basrur y col., 2010; Leal y col., 2011; Santos y col., 2010). El estrés crónico normalmente implica períodos de tiempo más largos y el cambio del metabolismo energético para hacer frente a las demandas del factor estresante, lo que implica más energía y recursos asignados al proceso de estrés (Tort, 2011). De hecho, un estudio realizado por Valenzuela y colaboradores (2018), arrojó luz sobre los mecanismos moleculares involucrados en los efectos negativos que el estrés crónico tiene sobre el equilibrio de la señalización anabólica/catabólica muscular, señalando que el estrés crónico producido por el hacinamiento afectó directamente al crecimiento muscular y reguló negativamente el sistema hormona de crecimiento / factor de crecimiento idéntico a la insulina (GH/IGF) en juveniles de platija (*Paralichthys adspersus*). Además, el estrés crónico también se ha demostrado que afecta a los mecanismos que regulan el apetito en los peces teleósteos, que parece estar mediado en parte por el factor liberador de corticotropina (Conde-Sieira y col., 2018). Estos datos obtenidos los interpretamos como la transición fisiológica a una respuesta terciaria de estrés crónico a largo plazo que se caracterizó por una disminución significativa en el rendimiento del crecimiento.

Estrés e inmunidad

En cuanto a la relación entre el estrés y el sistema inmunitario de los peces, se podría considerar que los estresores inducen efectos supresores o adversos generalmente, pero parte de las respuestas también se podría considerar como respuestas activas o potenciadoras y, por lo tanto, la resolución de este evento complejo dependerá del tiempo, de la respuesta inducida y del estresor (Tort, 2011). En el caso de un factor de estrés físico (lesiones, manipulación, etc.), la intensidad y la duración son componentes clave (Tort, 2011). En la literatura, se han descrito procesos tanto de activación como de supresión después de episodios de estrés (Demers & Bayne, 1997; Maule & Schreck, 1991; Sunyer y col., 1995). Sin embargo, los tratamientos a largo plazo normalmente muestran efectos supresores (Sunyer y col., 1995; Vazzana y col., 2002). En particular, la hipoxia inducida por la exposición al aire reduce la explosión respiratoria (Ortuño y col., 2002) y también retrasa la actividad de las células citotóxicas naturales del riñón cefálico en dorada (*S. aurata*) (Cuesta y col., 2003). Adicionalmente, un estudio realizado por Yin y colaboradores (1995) reportó una disminución de las proteínas totales en suero en carpas con estrés crónico causado por hacinamiento. Sadhu y colaboradores (2014) también demostraron una disminución en los niveles de proteínas totales en suero en la lubina

asiática (*L. calcarifer*) tras ser expuestas a estrés crónico por hacinamiento. En el presente estudio, no se observaron diferencias significativas en los parámetros inmunitarios celulares de los leucocitos de riñón cefálico de dorada (*S. aurata*) (fagocitosis, explosión respiratoria y actividad de peroxidasa) ni en los parámetros humorales séricos (proteínas totales, inmunoglobulinas totales, IgM total, peroxidasa, lisozima) en los peces sometidos a estrés crónico en comparación con los peces del grupo control. La experiencia previa a eventos de estrés determina la capacidad de generar una respuesta adicional y la eficiencia de los sistemas reguladores, incluida la actividad inmunológica (Dhabhar, 2002). En particular, los ejemplares utilizados en este experimento provenían de una piscifactoría en la que se realizaban muestreos regulares, por lo que ésta podría ser la razón por la que la respuesta del sistema inmunológico aparentemente no se vio afectada a nivel sistémico.

Las consecuencias de diferentes factores estresantes sobre las respuestas inmunitarias de los peces se han demostrado principalmente a nivel sistémico. En este trabajo, también hemos estudiado la respuesta inmunitaria local encontrando diferencias significativas en los niveles de proteínas, Igse IgM. Se encontraron diferencias significativas respecto al grupo en el nivel de Igs, proteínas e IgM, siendo el nivel de Igs y proteínas totales significativamente menor en el grupo S en comparación al grupo C. Por el contrario, el nivel de IgM fue significativamente mayor en el grupo S con respecto al grupo C. La concentración de proteína total se utiliza generalmente como indicador del estado de salud (Binuramesh y Michael, 2011), mientras que las Igs juegan un papel importante en la inmunidad adaptativa al reconocer patógenos y ayudar en su destrucción a través de varios procesos (Parra y col., 2015). Curiosamente, los niveles de IgM, que también es parte de la inmunidad adaptativa, fueron significativamente mayores en todos los tiempos experimentales, pero especialmente después de 14 días en los peces con estrés, en comparación con los peces control. Además, también se observó un aumento significativo en la actividad de la peroxidasa en los peces del grupo S, con respecto a los peces del grupo C después de 14 días. Sin embargo, no se encontraron diferencias respecto al grupo, al tiempo y tampoco se encontró interacción significativa en la actividad lisozima, proteasa y bactericida en el moco de la piel (*V. anguillarum* y *V. harveyi*).

Estos resultados ponen de manifiesto que el estrés crónico debido a la manipulación repetida indujo variaciones en las actividades inmunitarias, especialmente en la respuesta inmune local, lo que sugiere que el moco de la piel es muy sensible a este

Discusión general

tipo de estresor. De hecho, se ha sugerido que el tráfico alterado de linfocitos a la piel y posiblemente a otros lugares puede servir para mejorar las respuestas inmunitarias locales (Dhabar y col., 2002). Por lo tanto, las respuestas inmunitarias locales pueden activarse en una superficie particular sin una activación de los órganos centrales. Las respuestas de las mucosas en los peces son un ejemplo de estas respuestas locales independientes, que adquieren continuamente información del medio ambiente, la procesan y se adaptan para mantener la homeostasis mientras que los animales se enfrentan al estrés.

Estrés y composición microbiana

A día de hoy, existe limitada información sobre cómo los factores estresantes pueden afectar a las comunidades microbianas de los peces. Un estudio realizado por Webster y colaboradores (2020) mostró que ejemplares de salmón del Atlántico (*S. salar*) experimentaron cambios en la diversidad y composición de la microbiota fecal, incluida una reducción en la abundancia de *Carnobacterium*, una bacteria del ácido láctico comúnmente utilizada como probiótico en acuicultura, y niveles elevados de varias clases que contienen patógenos bacterianos proinflamatorios y oportunistas como Clostridia y Gammaproteobacteria después de la exposición a un factor estresante (confinamiento leve) durante dos semanas. Curiosamente, el estrés osmótico también alteró la microbiota intestinal en medaka (*Oryzias melastigma*), modulando la síntesis de metabolitos y facilitando la aclimatación a la salinidad tanto del huésped como de las propias bacterias. (Lai y col., 2020). Hasta ahora, la mayoría de los estudios sobre la interacción entre la microbiota de los peces y el estrés se han centrado en el intestino y solo algunos estudios han arrojado algo de luz sobre las interacciones entre la microbiota de la piel durante las respuestas al estrés (Boutin y col., 2013; Tacchi y col., 2015; Sylvain y col., 2020).

La diversidad microbiana protege a los ecosistemas frente a la disminución de su funcionalidad al mismo tiempo que permite la adaptación a condiciones cambiantes (Naeem y Li, 1997). En nuestro estudio, los resultados de las métricas de diversidad alfa indican que los peces S experimentaron un aumento significativo en la riqueza microbiana (Chao1) después de 28 días, mientras que se observó un aumento significativo en la diversidad microbiana (Shannon, Inverso de Simpson) después de 14 días, el cual persistió hasta el final del experimento en comparación con los peces C. Anteriormente, también se demostró que un evento estresante, como una infección por patógenos,

conduce a un aumento de la diversidad microbiana (Karlsen y col., 2017; Zhang y col., 2018). A pesar de que el estrés parece promover un aumento de la riqueza y la diversidad, estas diferencias se encontraron en los géneros cuya abundancia es menor al 1% (que representa aproximadamente el 20%).

En cuanto al análisis de diversidad beta, el PCoA mostró una clara separación de las comunidades microbianas a lo largo del tiempo, destacando el caso de los 28 días, que se dibujó como un clúster independiente. Se observaron diferencias significativas en la diversidad beta en la microbiota de la mucosa de la piel de los grupos C14 y S14, siendo C14 el grupo con mayor dispersión en sus muestras. En t28, también observamos diferencias significativas entre los grupos C28 y S28. Sin embargo, esta diferencia entre los grupos C28 y S28 se encontró que estaba en el límite para ser considerado significativo ($p = 0,05$). En este contexto, se observa una diferencia más clara entre las comunidades microbianas de los peces C y S a los 14 días mientras que a los 28 días observamos un fenómeno de habituación ya que la comunidad microbiana de los peces S28 tiende a volver al estado propio de los peces del grupo C.

En cuanto a la taxonomía, los géneros *Pseudoalteromonas* y *Marinagarivorans* sufrieron un aumento significativo después de 14 días de aplicar estrés mientras que *Acinetobacter*, *NS3a-Marine-Group* y *Pseudomonas* sufrieron una reducción significativa en su abundancia. El género *Pseudoalteromonas* es proteasa positivo y numerosas cepas se relacionan con la inhibición de patógenos de peces del género *Vibrio* o *Photobacterium* (Richards y col., 2017) y una variedad de bacterias marinas Gram-positivas (Tang y coll., 2020). Adicionalmente, se ha comprobado que *Pseudoalteromonas* influye en la germinación y metamorfosis de varios invertebrados y especies de algas (Bowman, 2007; Peng y col. 2020), pudiendo también ser adoptado por la microbiota y fauna marina como agente defensivo, por lo que podría asumirse que es probiótico, al menos algunas de sus especies (Wang y col., 2018; Wasuma y col., 2021). La bacteria agarolítica *Marinagarivorans* ha sido descrita recientemente y hasta ahora solo se conoce su efecto sobre ciertos carbohidratos de origen algal, pero no se puede establecer su papel como miembros de la microbiota de estos peces (Li y col., 2020). En correspondencia con nuestros resultados, *NS3a-Marine-Group*, se describió en la microbiota normal de branquias y piel de dorada (*S. aurata*) en una abundancia relativa de 2-12% (Rosado y col., 2019). Con respecto al género *Acinetobacter*, algunas especies han sido descritas como patógenos importantes en acuicultura (Cao y col., 2018; Malick

y col., 2020) siendo el caso de *A. pittii* que es resistente a múltiples antibióticos (Li y col., 2017). De forma similar, el género *Pseudomonas* está muy representado en la microbiota de la piel de la lubina (*D. labrax*) (Pimentel y col., 2017). Las especies patógenas de *Pseudomonas* también se conocen en la acuicultura, como *P. baetica* (López y col., 2012).

Después de 14 días de estrés, el aumento de géneros con potencial capacidad bactericida, así como la disminución de géneros con potencial patogenicidad, muestra que las modificaciones de la microbiota de la piel de los peces estresados tienden a proteger el tejido de futuros daños o infecciones. Esta tendencia también se ve reflejada a los 28 días de estrés, donde la microbiota de la piel de los peces estresados mantiene el aumento significativo de la abundancia de *Pseudoalteromonas*, además de la aparición del género *Rubritalea*. Además, la clase Actinobacteria también aumentó la abundancia en el grupo estresado con respecto al grupo control a los 28 días. Estudios propios que se discutirán con más detalle en el siguiente capítulo, mostraron al género *Rubritalea* como posible marcador de una microbiota asociada a la piel sana de la lubina (*D. labrax*) y en caso de disbiosis por infección bacteriana, fue el género que mostró más variaciones en la presencia del patógeno (Cámara-Ruiz y col., 2021).

Definir el estado de bienestar de los peces es complejo y la identificación de indicadores fiables representa un desafío en acuicultura. Actualmente se está utilizando una amplia gama de medidas físicas, fisiológicas y de comportamiento para evaluar el bienestar de los peces, pero solo se puede obtener un indicador preciso mediante la integración e interpretación de varios indicadores (Ashley, 2007). Los resultados de este estudio muestran que el estrés por exposición al aire está asociado con alteraciones en la inmunidad y la composición microbiana de la mucosa de la piel. Tales alteraciones no provocaron una disbiosis de la microbiota de la piel, sino una modulación que pudo haber sido beneficiosa para el huésped en su adaptación al estrés.

La vibriosis

Dentro de las patologías que pueden sufrir los peces marinos, la vibriosis es una de las enfermedades más comunes que provocan mortalidades masivas, afectando también a camarones y crustáceos (Ina-Salwany y col., 2019; Novriadi, 2016; Toranzo y col., 2005). La vibriosis es una patología transmitida principalmente por *Listonella anguillarum*, halófila gramnegativa (antes *V. anguillarum*), y, con menor frecuencia, por otras especies relacionadas *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. ordalii*, *V. vulnificus*. Todas las especies de peces cultivadas en la cuenca mediterránea se ven afectadas por la vibriosis, siendo la lubina (*D. labrax*) la más sensible (Vendramin y col., 2016). La infección por vibriosis puede transmitirse a través del agua o vía ingestión siendo el período de incubación relativamente corto (3 días aproximadamente) aunque depende de muchos factores siendo crucial la virulencia del patógeno y la susceptibilidad de las especies (Mohamad y col., 2019). También se asume que la convivencia en proximidad entre peces enfermos y sanos puede contribuir a la propagación de la enfermedad.

La mayoría de las infecciones causadas por microorganismos (bacterias, virus o parásitos) comienzan o afectan principalmente a las mucosas del epitelio de los peces (Gomez y col., 2013). Las superficies mucosas están expuestas a una variedad de antígenos mientras coexisten con microorganismos comensales y oportunistas (Kelly & Salinas, 2017). Sin embargo, a pesar de la importancia de las superficies mucosas en el proceso de infección y la prevalencia de esta enfermedad en acuicultura, la respuesta inmunitaria y la microbiota de la mucosa de la piel asociada a esta enfermedad no han sido estudiados en profundidad. De hecho, solo unos pocos estudios en los cuáles se comparan la microbiota de la piel de peces enfermos y sanos han sido publicados y, por lo tanto, es difícil obtener una descripción completa de cómo las comunidades microbianas ejercen efectos sobre el estado de salud de los peces (Karlsen y col., 2017; Llewellyn y col., 2017; Miyake y col., 2020; Reid y col., 2017; Tapia-Paniagua y col., 2018; Zhang y col., 2018). Es importante mencionar que ninguno de estos estudios está relacionado con un brote de vibriosis en lubina (*D. labrax*).

La respuesta inmunitaria y de la microbiota durante la vibriosis

En el **capítulo 2**, la respuesta inmunitaria (sistémica y local) y la composición de la microbiota del moco de la piel fueron estudiadas en lubina (*D. labrax*) durante el curso natural de un brote de enfermedad asociada posteriormente a *V. harveyi*. En este estudio, se analizaron y compararon los datos obtenidos de peces considerados como infectados (con sintomatología) y no infectados (sin sintomatología). Como ya se explicó en la metodología, se observaron grandes lesiones en la piel en algunos animales de los diferentes tanques. Sin embargo, es importante subrayar que finalmente, la infección se resolvió sola sin administrar ningún tratamiento a los peces. En otras palabras, algunos peces no llegaron a mostrar sintomatología de la enfermedad, a pesar de estar conviviendo con los infectados. En este estudio, *V. harveyi* fue identificado, con técnicas de aislamiento y moleculares, como el agente causante de las úlceras observadas en los animales. Sin embargo, no se puede afirmar con certeza si *V. harveyi* fue la única responsable de la enfermedad o si fue debido a la actuación de dos o más taxones bacterianos (co-infección), a la presencia de invasores secundarios o incluso contaminantes casuales (Zhang y col., 2020).

La respuesta inmunitaria frente a la infección por *V. harveyi*

La piel, las escamas y el moco sirven como barrera natural física contra patógenos y sustancias extrañas. El moco de la piel contiene glicoproteínas o proteínas mucopolisacáridicas producidas principalmente por células caliciformes presentes en el epitelio (Dalmoy col., 1997; Sadovy y col., 2005). Además, el moco de la piel contiene moléculas humorales innatas y anticuerpos específicos (Esteban y Cerezuela, 2015). En este estudio, se analizaron varios parámetros del sistema inmunológico con el fin de establecer los principales mecanismos involucrados en la respuesta inmunitaria frente a un brote natural de vibriosis, para desarrollar medidas preventivas correctas y reducir la incidencia de dicha enfermedad de la forma más sostenible posible en un futuro. Con respecto a la respuesta inmunitaria de la mucosa de la piel (respuesta local), se observó una disminución significativa de la actividad proteasa en los peces I con respecto al grupo NI. Las proteasas se clasifican en serina, cisteína, aspártica y metaloproteasas según la naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis (Hartley, 1960). Se ha demostrado que el

moco de la piel de los peces tiene proteasas serinas tales como tripsina (Hjelmeland y col., 1983); cisteína proteasas (Aranishi y Nakane, 1997) y proteasas aspárticas como catepsina D (Cho y col., 2002) y metaloproteasas Fast y col., 2002). Estas enzimas pueden actuar directamente sobre patógenos bacterianos, escindiendo sus proteínas y provocando la muerte de las bacterias (Subramanian y col., 2007). La reducción de la actividad proteasa por varios factores estresantes en la mucosidad de la piel está relacionada con la defensa contra bacterias o infecciones parasitarias (Guardiola y col., 2019). En el estudio realizado por Guardiola y colaboradores (2019) en el que se analizó la respuesta inmunitaria de lenguado (*Senegalese sole*) frente a la bacteria *Tenacibaculum maritimum*, la actividad proteasa (sistémica y local) se potenció durante el principio (primeras horas) y disminuyó hacia el final del curso de la infección (14 d). Esto concuerda con los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, ya que en este estudio las muestras se tomaron 3 días después de la aparición de las lesiones de la piel. Con respecto a la inmunidad adquirida en moco, no se observaron diferencias significativas en niveles de Igs (Ig totales o IgM) entre ambos grupos de peces (NI/I), probablemente debido al hecho de que el proceso de infección todavía era demasiado inicial como para ver efectos en los niveles de inmunoglobulinas. Además, las lubinas de este experimento estaban todavía en su etapa juvenil, con lo cual su sistema inmunitario adaptativo no estaba desarrollado plenamente y quizás era la primera exposición frente a esta enfermedad para ver una estimulación de los anticuerpos en fases tan tempranas de la infección.

En cuanto a la respuesta inmunitaria sistémica, también se observó una disminución significativa de la actividad proteasa en el suero de peces I por *V. harveyi*, que podría estar también relacionada con misma reducción observada en la respuesta inmunitaria local. Además, la actividad de la lisozima fue significativamente menor en el suero de peces I en comparación con peces NI. La lisozima es una molécula esencial en la defensa del sistema inmunológico innato, que es importante para mediar la protección frente a una invasión microbiana (Saurabh y Sahoo, 2008). La lisozima actúa directamente sobre las bacterias grampositivas provocando la lisis de su capa más externa de peptidoglicano (Chipman y col., 1969). En bacterias gramnegativas, actúa como consecuencia de la degradación de la membrana externa por el complemento y otras enzimas que exponen la capa de peptidoglicano (Chipman y col., 1969). En este caso, todas las especies de *Vibrio* son gramnegativas con una pared celular formada principalmente por LPS. La significativa reducción de estas dos actividades (proteasa y

Discusión general

lisozima) en suero podría indicar que el sistema inmunológico de la lubina podría estar usándolas como mecanismos de defensa para combatir la infección. También es plausible que el estado de protección inmunitaria baja haya sido el evento desencadenante para que estos peces sucumbieran a la enfermedad, ya que las bacterias del género *Vibrio* están normalmente presentes tanto en el agua como en la microbiota autóctona de la lubina, pero se puede convertir en patógena cuando la defensa inmunitaria se ve incapacitada por situaciones estresantes (Parisi y col., 2015). Por el contrario, se observó un aumento significativo en los valores de actividad peroxidasa en suero de peces I en comparación a los peces NI. Los presentes resultados coinciden con los observados en el lenguado senegalés después de 7 días de una prueba con *T. maritimum* (Guardiola y col., 2019). En el caso de las peroxididasas, estas enzimas son capaces de eliminar de forma eficaz el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de mantener el equilibrio redox del sistema inmunológico (Guardiola y col., 2014). En este estudio, el hecho de que esta actividad sea significativamente mayor en los peces I podría indicar que las bacterias implicadas en la infección probablemente están induciendo la producción de una cantidad razonable de especies reactivas al oxígeno (ROS) y la actividad de la peroxidasa sérica es la encargada de reducir tal desequilibrio (Scialò y col., 2017). Además, es tentador considerar que dicha enzima es esencial para la inmunidad contra las bacterias, al igual que otras enzimas importantes en el equilibrio redox, como la glutatión peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa. Estas enzimas deberían estudiarse en estudios futuros de infecciones provocadas por esta bacteria para comprender el papel e implicaciones de las ROS en la salud y en la enfermedad de los peces. En el presente estudio, no fue posible debido al bajo volumen de suero que se obtuvo de cada muestra a consecuencia del pequeño tamaño de los peces.

La respuesta de la microbiota frente a la infección por *V. harveyi*

La diversidad y riqueza de especies tienen un efecto sobre la funcionalidad y la estabilidad de los ecosistemas microbianos (Bell y col., 2005; Wittebolle y col., 2009). Con respecto a la diversidad y riqueza microbiana en peces enfermos, diversos estudios han demostrado que una infección no siempre da como resultado pérdidas de la diversidad microbiana general. Un estudio analizó la diversidad del microbioma de la piel de peces control y peces infectados por el alfavirus en salmón del Atlántico (*S. salar*), informando que en los peces infectados experimentalmente se redujeron la mayoría de las

Proteobacterias y por el contrario, aumentaron la abundancia de taxones oportunistas como *Flavobacteriaceae*, *Streptococcaceae* y *Tenacibaculum* (Reid y col., 2017). Curiosamente, una infección por el parásito causante de la enfermedad del punto blanco (*Ichthyophthirius multifiliis*) en la trucha arco iris (*O. mykiss*) también condujo a un rápido aumento en la diversidad y un cambio general en la microbiota de la piel (Zhang y col., 2018). Por el contrario, la diversidad de la microbiota del moco de la piel del salmón del Atlántico (*S. salar*) fueron evaluados a lo largo del tiempo después de brotes naturales de *Aeromonas salmonicida* en una piscifactoría, concluyendo que la diversidad microbiana disminuyó con el tiempo debido a una sobrerrepresentación de *A. salmonicida* en la comunidad bacteriana (Cipriano y col., 2011). Otro estudio indicó que el salmón del Atlántico experimentó una pérdida de riqueza microbiana, pero un aumento en la diversidad, dando lugar a una desestabilización de la composición de la microbiota de la piel después de una infección por piojos del salmón (*Lepeophtheirus salmonis*) (Karlsen y col., 2017).

En el presente estudio, cuando la diversidad alfa fue comparada, los resultados mostraron que los peces I con *V. harveyi* mostraron una diversidad significativamente mayor (Shannon) en la comunidad microbiana en comparación a la del grupo NI. Estos resultados son complementarios a los obtenidos en los índices Chao1 e inverso de Simpson, en el que hubo un aumento no significativo de riqueza microbiana en el grupo I. Además, se produjeron cambios significativos en la diversidad beta en el moco de la piel de la lubina, lo que indica que las comunidades microbianas de los peces I y los NI fueron significativamente diferentes, mostrando signos claros que podrían corresponderse con una situación de disbiosis y un cambio en la composición general de la microbiota. En el análisis NMDS, una muestra del grupo NI se agrupó con el grupo infectado (NI 1). Esta muestra podría representar una etapa temprana de la infección, sin embargo, no hubo oportunidad de seguir la evolución de la infección y determinar si la infección finalmente hubiera prosperado en este espécimen.

La microbiota del huésped juega un papel importante en el control de patógenos, pudiendo prevenir y controlar la infección mediante mecanismos como la exclusión de nichos, la competencia por nutrientes o antagonismo (de Bruijn y col., 2018). En este sentido, un estudio reciente observó que una combinación de especies bacterianas cultivables de la trucha arco iris pudo conferir protección contra infecciones por *Flavobacterium columnare*, inhibiendo la población de patógenos (Perez-Pascual y col., 2021). La microbiota de la piel de lubina infectada por *V. harveyi* presentó porcentajes de abundancia modificados de

diferentes taxones bacterianos. Esta alteración de la comunidad microbiana puede implicar una pérdida de la capacidad de controlar las poblaciones de patógenos. Además, a las comunidades bacterianas también se le ha atribuido un papel en la modulación de la respuesta inmunitaria frente a patógenos (de Bruijn y col., 2018). Las bacterias comensales pueden inducir una respuesta inflamatoria (Galindo-Villegas y col., 2012) y activar la respuesta inmune innata (Maynard y col., 2012), todas esenciales para la lucha contra patógenos en los peces. Si los taxones identificados en la microbiota de lubinas infectadas son responsables de los cambios observados en las actividades inmunitarias (proteasa, lisozima, peroxidasa) observadas en el presente estudio deberá determinarse en estudios posteriores.

Nuestros resultados indican que la microbiota de la piel del grupo Ipor *V. harveyi* estuvo dominada por el filo de Proteobacteria seguido por el filo de Verrucomicrobia y Patescibacteria; mientras que, en el grupo NI se encontró que el filo dominante era Verrucomicrobia seguido de Proteobacteria y Firmicutes. En contraste con nuestros resultados, estudios sobre la microbiota de diferentes áreas de la piel de lubina determinaron que la biodiversidad de comunidades microbianas fue diferente dependiendo del área de piel estudiada, pero en ninguna el filo Verrucomicrobia fue reportado como predominante (Chiarello y col., 2015). Cambios significativos en la diversidad filogenética de la microbiota de la piel pueden producir alteraciones en su funcionalidad para inducir enfermedades (Boutin y col., 2013), y de acuerdo con esta hipótesis, en nuestro estudio la comparación entre la microbiota de la piel de lubinas infectadas y no infectadas mostró que la diversidad filogenética se vio afectada cuantitativamente. En concreto, la abundancia de Proteobacterias y de Verrucomicrobia fue significativamente mayor en el grupo infectado y no infectado, respectivamente. Con respecto a la clase, γ -Proteobacteria fué la clase predominante clase del grupo I (41% aproximadamente) mientras que Verrucomicrobiae fue la clase dominante del grupo NI (48% aproximadamente). Además, se observaron diferencias significativas a nivel de clase, siendo las γ -Proteobacterias, significativamente más abundantes en el grupo I mientras que Verrucomicrobiae fue la clase representativa del grupo NI. Estas diferencias podrían deberse al hecho de que *V. harveyi*, perteneciente al filo de las Proteobacterias y a la clase γ -Proteobacteria, fue el agente causante más probable de las úlceras de la piel y hubo una sobrerrepresentación de esta especie en comparación con las demás.

Rubritalea fue el género dominante en la microbiota del moco de la piel de los peces NI, siendo un biomarcador de este grupo. Varios estudios han informado sobre la presencia de *Rubritalea* en el moco, tanto de la piel como de las branquias, en la lubina sana (Rosado y col., 2021; 2019). Existen estudios que han descrito la capacidad de producir escualeno y carotenoides por este género bacteriano (Yoon y col., 2007, 2008). El escualeno es un precursor triterpénico lineal para la síntesis de metabolitos secundarios como esteroides, hormonas o vitaminas (Yoon y col., 2007) y también se ha demostrado su capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana (Yoon y col., 2008). Además, los carotenoides actúan como antioxidantes y son precursores de vitamina A. Por esta razón, la presencia de *Rubritalea* en peces asintomáticos podría estar asociada con un estado saludable de la barrera de la piel.

Curiosamente, como se mencionó anteriormente, el análisis NMDS mostró que el patrón de microbiota de una de las muestras de los peces NI (NI 1) se asoció con los patrones de microbiota de los peces I. En este espécimen, la abundancia de *Rubritalea* fue menor en comparación con la abundancia de este género en otras muestras no infectadas. Por otro lado, la abundancia de *Vibrio* no fue tan elevada como en las demás muestras infectadas. Estos resultados sugieren la modulación de la microbiota del moco de la piel de este pez hacia un patrón de microbiota más similar al de los peces infectados, pero sin sintomatología debido a la menor abundancia de *Vibrio*. Por lo tanto, podemos sugerir que, en este caso, *Vibrio* es el taxón clave asociado a los peces enfermos. En estudios similares en los que se estudiaron las comunidades microbianas en úlceras de la piel en peces, se encontró que las especies de *Tenacibaculum* y *Arcobacter* dominaban la composición de la microbiota de la piel ulcerosa del salmón del Atlántico (*S. salar*) (Karlsen y col., 2017). *Vibrio*, *Tenacibaculum*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas* también se han asociado con enfermedades de la piel del salmón del Atlántico (*S. salar*) (Ghimire y col., 2015; Reid y col., 2017).

Nuestros resultados demostraron que a las lubinas infectadas con *V. harveyi* mostraron cambios en la composición de la microbiota del moco de la piel, siendo Proteobacterias el filo dominante que colonizó dicho moco a la vez que competían con otros filos, especialmente Verrucomicrobia, de acuerdo con estudios previos (Llewellyn y col., 2014; Reid y col., 2017; Tapia-Paniagua y col., 2018; Zhang y col., 2018). Además, la infección se asoció con cambios en la composición bacteriana y también se detectaron diferencias significativas en la respuesta inmunitaria de la mucosa del huésped. La actividad

peroxidasa parece tener un papel importante en el curso de la infección mientras que la proteasa y la lisozima parecen ser los primeros mecanismos actuar frente a esta infección. Como se ha mencionado anteriormente, es posible que la enfermedad pudiera deberse al estado de inmunosupresión de ciertos ejemplares, destruyendo la capacidad defensiva de los peces.

La microbiota como herramienta para la prevención de infecciones bacterianas

Caracterizar las superficies mucosas y la composición microbiana de las especies de peces económicamente importantes, como la lubina, son de vital importancia para la detección temprana de posibles brotes de enfermedades en las piscifactorías. En las últimas décadas, la integración de buenas prácticas, como la cuarentena, optimización de la calidad del agua, una alimentación de alta calidad, la cría de reproductores resistentes a enfermedades y el establecimiento de un programa de vacunación han servido como estrategias alternativas para combatir las enfermedades de los peces (FAO, 2020; Pridgeon y Klesius, 2012). Aunque las vacunas para especies específicas han demostrado una protección eficaz contra cepas bacterianas, la diversidad antigénica de las cepas de *Vibrio* y sus serotipos han hecho que las vacunas no puedan inducir protección contra múltiples infecciones por *Vibrio* (Li y col., 2020). Dado que el desarrollo de vibriosis requiere adherencia, establecimiento y multiplicación de *Vibrio* spp. en el huésped, el control y la prevención deben implementarse hacia estos pasos cruciales del desarrollo de la enfermedad. Los biomarcadores identificados, tanto en la respuesta inmunitaria como en la microbiota, en el presente estudio pueden contribuir a elaborar un sistema de detección precoz de esta enfermedad en acuicultura y evitar pérdidas importantes. Además, en un futuro próximo, estudios metagenómicos y transcriptómicos serán útiles para comprender la funcionalidad de los microbiomas de los peces y dilucidar sus interacciones con el sistema inmunitario.

La diversidad de la microbiota intestinal de los peces estudiada mediante un método no invasivo

Estudios recientes que han utilizado tecnologías NGS han encontrado que los filos Proteobacteria, Fusobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Clostridia, Bacilli y Verrucomicrobia son los filos que se encuentran principalmente en la microbiota intestinal de los peces (Ghanbari y col., 2015). Entre estos, Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes representan hasta el 90% de la microbiota intestinal en diferentes especies (Carda-Diéguez y col., 2014; Desai y col., 2012; Li y col., 2013; Ringø y col., 2006). El hecho de que taxones bacterianos similares estén presentes en la microbiota intestinal de peces de la misma o de diferentes especies indica que estos podrían ser considerados potencialmente como una "microbiota intestinal central o común" y que estas poblaciones pueden contribuir de manera importante a la correcta funcionalidad intestinal y en consecuencia al rendimiento y salud de los peces (Desai y col., 2012; Rawls y col., 2004; Roeselers y col., 2011; van Kessel y col., 2011; Wong y col., 2013).

Teniendo en cuenta la información disponible sobre la microbiota intestinal en peces teleósteos, se ha sugerido que algunas especies bacterianas parecen ser transitorias mientras que otras parecen residir en el tracto gastrointestinal de los peces (Kim y col., 2007). En particular, nuestro estudio presentado en el **capítulo 3** tuvo como objetivo comparar estudiar ambas comunidades para evaluar si un método no invasivo podría ser factible y fiable para conocer la comunidad microbiana del intestino posterior de los peces sin necesidad de sacrificar al animal. Así, se consideró bacteria alóctona la que se encuentra en el alimento/heces mientras que la presente en la mucosa/tejido se consideró autóctona, en base a estudios previos (Gajardo y col., 2016; Ringø y col., 2006). Sin embargo, algunas bacterias autóctonas pueden estar presentes en el alimento/heces ya que el método de recolección utilizado podría arrastrar parte de la mucosa intestinal.

En cuanto a la taxonomía, Proteobacteria fue el filo más abundante encontrado tanto en la comunidad autóctona (IP) como en la alóctona (H) seguido de Cianobacterias, Firmicutes, Espiroquetas y Fusobacterias, aunque con diferentes porcentajes. Se encontró una abundancia mayor, pero no estadísticamente significativa, de Proteobacteria, Firmicutes y Fusobacteria en la comunidad alóctona, mientras que se observó el mismo fenómeno con Cianobacteria en la comunidad autóctona. Además, el filo Spirochaetes

Discusión general

solo se encontró (por encima del 1%) en la comunidad autóctona. De manera similar, otros estudios han encontrado que las Proteobacterias es el filo dominante en especies marinas (Butt & Volkoff y col., 2019). Existen datos que demuestran que los filos dominantes encontrados en el tracto GI de dorada son Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes (Paula Silva y col., 2011; Estruch y col., 2015). En este estudio, los filos Actinobacteria y Bacteroidetes no fueron reportados como filos dominantes en la microbiota intestinal de dorada.

Muchas especies de peces tienen su microbiota intestinal dominada por la clase γ -Proteobacteria (Rawls y col., 2004; Romero y Navarrete 2006; Kim y col., 2007; Ward y col., 2009) y las especies de *Vibrio* suelen ser las bacterias dominantes y comunes en la microbiota intestinal sobre todo en peces marinos (Martin-Antonio y col., 2007; Ward y col., 2009). De acuerdo con esta información, nuestros resultados confirmaron que la microbiota intestinal (autóctona y alóctona) de la dorada está dominada principalmente por la clase γ -Proteobacteria (65,8%).

Los géneros detectados fueron *Photobacterium*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Cetobacterium* y *Lactobacillus* con porcentajes de abundancia relativa >1%. Dentro de estos géneros, podemos encontrar especies tales como *Photobacterium damsela*, *Vibrio ponticus*, *Vibrio alfacensis*, *Cetobacterium somerae* entre otros. Varias especies de los géneros detectados han sido clasificadas como patógenos oportunistas como son las especies *Photobacterium damsela* o *Vibrio harveyi*. Normalmente son colonizadores comunes del tracto digestivo de los peces, pero en condiciones de estrés o enfermedad del animal, se han reportado como agentes causantes de muertes masivas en diferentes especies como la lubina asiática (*L. calcarifer*), el rodaballo (*Psetta maxima*), pargo rosa manchado (*Letujanus guttatus*), dorada (*S. aurata*) o lubina (*D. labrax*) entre otras (Abdel-Aziz y col., 2013; Fouz y col., 1992; Gomez-Gil y col., 2007; Kanchanopas-Barnette y col., 2009). Una de las especies más interesantes que se encuentran en el intestino de los peces es *C. somerae* del filo Fusobacteria. Se sabe que esta especie produce altas cantidades de vitamina B12 y puede inhibir el crecimiento de patógenos potenciales (Larsen y col., 2014; Sugita y col., 1996). En este estudio, el género *Cetobacterium* se encontró en ambas poblaciones bacterianas (autóctonas y alóctonas), con un porcentaje mayor (pero no significativo) en la comunidad autóctona. Esto podría implicar su importante papel en la funcionalidad intestinal. De manera similar, se ha

descubierto que las bacterias del ácido láctico (a menudo *Lactobacillus* sp.) son un componente menor de la microbiota intestinal, pero se consideran cruciales para promover la salud de los peces y bloquear el establecimiento y el crecimiento de patógenos potenciales (Izvekova y col., 2007). *Lactobacillus* también se encontró en poblaciones bacterianas autóctonas y alóctonas en este estudio, con un porcentaje mayor (pero no significativo) en el intestino posterior (autóctono) en comparación con la comunidad bacteriana de contenido fecal (alóctona).

La diversidad y riqueza de las poblaciones bacterianas se estudiaron mediante métricas de diversidad alfa (índices de Chao1, Shannon e inverso de Simpson). La riqueza esperada total calculada por el índice Chao1 y el índice de diversidad inverso de Simpson no mostró diferencias significativas entre las dos comunidades bacterianas, autóctona y alóctona ($p < 0,05$). De manera similar, la diversidad esperada total calculada por el índice de Shannon no mostró diferencias significativas en ninguno de los niveles estudiados entre las dos poblaciones bacterianas ($p < 0,05$). La diversidad beta mide las diferencias entre muestras de diferentes grupos para identificar si existen diferencias en la composición y estructura general de la comunidad (Legendre y col., 2005). En este estudio, se analizó la diversidad beta mediante el escalamiento multidimensional no métrico (NMDS).

Según nuestros resultados, no se observaron diferencias significativas entre la composición y estructura de las bacterias autóctonas y alóctonas, lo que junto con el estudio taxonómico y los resultados de la diversidad alfa, podrían señalar que el contenido fecal/heces, podría usarse como una matriz para determinar el estado de la microbiota localizada en el intestino posterior en lugar de la mucosa/tejido intestinal, lo que podría traducirse en evitar el sacrificio de animales para recolectar muestras de microbiota intestinal. Este resultado es de gran interés teniendo en cuenta los principios para un uso más ético de los animales en experimentación animal. En el caso de este estudio, los animales fueron sacrificados al tener que recolectar el tejido intestinal obligatoriamente. En futuros estudios sería interesante utilizar métodos de masaje abdominal para obtener el contenido intestinal fácilmente sin la necesidad de sacrificar a los animales.

Además, se ha sugerido que las heces son útiles para el análisis de metabolitos para estudiar el metabolismo de la microbiota intestinal de los peces (Deda y col., 2015), así como una matriz eficaz para la identificación de marcadores diagnósticos de

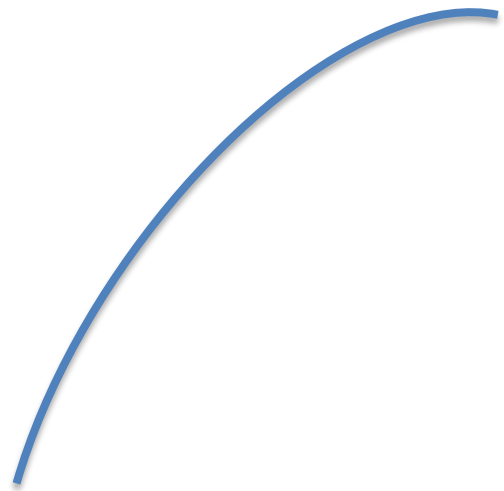
Discusión general

enfermedades intestinales y hepáticas en mamíferos (Cao y col., 2011; Van Rheenen y col., 2010). De hecho, las heces se han utilizado para detectar genes resistentes a antibióticos o la sensibilidad de la mucosa de dorada a patógenos bacterianos (Barros y col., 2012; Peñaranda y col., 2020).

Con respecto a los biomarcadores detectados, se detectaron *Bacteroides* en la microbiota autóctona, lo que se ha vinculado con una acción antiinflamatoria en mamíferos (Zhou y col., 2016). Por su parte, el género *Tropicibacter* fue detectado como principal biomarcador de la microbiota alóctona. *Tropicibacter* es un género descrito en el agua marina y se ha detectado como microbiota asociada al intestino de animales acuáticos como el mero de pintas naranjas (*Epinephelus coioides*) y el pepino de mar (*Apostichopus japonicus*) (Lucena y col., 2012; Wang y col., 2021; Xiao Joe y col., 2021). Estas bacterias son capaces de degradar hidrocarburos como el naftaleno, alquilnaftalenos y fenantrenos (Harwati y col. 2009)

Para concluir, nuestro estudio proporciona una información más amplia sobre la composición de la microbiota intestinal de la dorada, que coincide parcialmente con estudios previos en esta misma especie. Además, hemos diferenciado entre bacterias autóctonas y alóctonas al separar las heces y el tejido intestinal para caracterizar ambas comunidades bacterianas. Los resultados demuestran el valor de las heces como método de recolección y estudio no invasivo. Aunque en este estudio el método de recolección haya resultado ser no invasivo, nos indica el potencial de las heces y futuros estudios deberán ser enfocados al método de recolección más idóneo para el contenido intestinal. Sin embargo, la microbiota intestinal de los peces está influenciada por varios factores que incluyen la especie hospedadora, la genética, la etapa de desarrollo, el sexo, el medio ambiente o la dieta, entre otros, y se necesitan muchos más estudios para corroborar estos resultados (Piazzon y col., 2020). Además, la caracterización de las diversas comunidades microbianas representa un enfoque significativo hacia una mejor comprensión de los factores que determinan la composición y funcionalidad de la microbiota presente en diferentes regiones.

Conclusiones



1. El estrés causado en dorada por exposición repetida al aire provocó alteraciones en la inmunidad del moco de la piel y en su composición microbiana.
2. Las alteraciones detectadas en el moco de la piel de doradas estresadas por hipoxia no provocaron posibles situaciones disbióticas, sino una modulación de la microbiota que podrían calificarse de beneficiosa para el huésped, facilitándole la adaptación al estrés.
3. Se ha demostrado la existencia de modificaciones en la microbiota de la piel de ejemplares de lubina infectadas por *V. harveyi*, las cuales parecen implicar una pérdida de la capacidad de la microbiota cutánea para controlar las poblaciones de posibles patógenos oportunistas.
4. Se han identificado parámetros tanto en la respuesta inmunitaria como en la microbiota de la piel de lubina que podrían contribuir a elaborar un sistema de detección precoz de la vibriosis con vistas a la realización de controles tempranos de esta infección. Igualmente, y derivado de este estudio se deriva la necesidad de más investigaciones similares a esta en otras especies piscícolas cultivadas para poder establecer el análisis de la microbiota de la piel como medida temprana en el control de enfermedades.
5. Los resultados obtenidos en los índices de diversidad / riqueza bacteriana y en la estructura de las comunidades bacterianas presentes en intestino posterior y heces de dorada mostraron un alto grado de similitud, demostrando el potencial del estudio de la microbiota de las heces como método no invasivo para el análisis de la microbiota intestinal.

Bibliografía

- Abdel-Aziz, M., Eissa, A. E., Hanna, M., & Okada, M. A.** (2013). Identifying some pathogenic *Vibrio/Photobacterium* species during mass mortalities of cultured Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) from some Egyptian coastal provinces. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 1(2), 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2013.10.004>
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., & Mohsin, M.** (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2), 733–741. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.038>
- Al-Harbi, A. H., & Uddin, M. N.** (2004). Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 229(1–4), 37–44. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00388-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00388-0)
- Ali, S. E., Jansen, M. D., Mohan, C. V., Delamare-Deboutteville, J., & Charo-Karisa, H.** (2020). Key risk factors, farming practices and economic losses associated with tilapia mortality in Egypt. *Aquaculture*, 527, 735438. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735438>
- Alves, R. N., Cordeiro, O., Silva, T. S., Richard, N., de Vareilles, M., Marino, G., ... Conceição, L. E. C.** (2010). Metabolic molecular indicators of chronic stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) using comparative proteomics. *Aquaculture*, 299(1–4), 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.014>
- APROMAR.** (2020). La acuicultura en España. Informe realizado por la asociación empresarial de acuicultura de España (APROMAR).
- Aranishi, F., & Nakane, M.** (1997). Epidermal proteases of the Japanese eel. *Fish Physiology and Biochemistry*, 16(6), 471–478. <https://doi.org/10.1023/A:1007736804243>
- Arends, R. J., Mancera, J. M., Muñoz, J. L., Wendelaar Bonga, S. E., & Flik, G.** (1999). The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology*, 163(1), 149–157. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1630149>
- 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>
- Austin, B.** (2006). The bacterial microflora of fish, revised. *The Scientific World Journal*, 6, 931–945. <https://doi.org/10.1100/tsw.2006.181>
- Avella, M. A., Place, A., Du, S. J., Williams, E., Silvi, S., Zohar, Y., & Carnevali, O.** (2012). *Lactobacillus rhamnosus* accelerates zebrafish backbone calcification and gonadal differentiation through effects on the GnRH and IGF Systems. *PLoS ONE*, 7(9), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045572>

- Bairagi, A., Ghosh, K. S., Sen, S. K., & Ray, A. K.** (2002). Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*, *10*(2), 109–121. <https://doi.org/10.1023/A:1021355406412>.
- Balcázar, J. L., Rojas-Luna, T., & Cunningham, D. P.** (2007). Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *96*(2), 147–150. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.04.008>.
- Barros, J., Andrade, M., Radhouani, H., López, M., Igrejas, G., Poeta, P., & Torres, C.** (2012). Detection of vanA-containing Enterococcus species in faecal microbiota of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Microbes and Environments*, *27*(4), 509–511. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME11346>
- Barton, B. A.** (2002). Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, *42*(3), 517–525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>.
- Basrur, T. V., Longland, R., & Wilkinson, R. J.** (2010). Effects of repeated crowding on the stress response and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiology and Biochemistry*, *36*(3), 445–450. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9314-x>.
- Bates, J. M., Akerlund, J., Mittge, E., & Guillemin, K.** (2007). Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell Host and Microbe*, *2* (6), 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.10.010>.
- Bayne, C. J., & Levy, S.** (1991). The respiratory burst of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), phagocytes is modulated by sympathetic neurotransmitters and the ‘neuro’ peptide ACTH. *Journal of Fish Biology* *38*, 609–619.
- Bayunova, L., Barannikova, I., & Semenkova, T.** (2012). Sturgeon stress reactions in aquaculture. *Journal of Applied Ichthyology*, *18*, 397–404.
- Bell, T., Newman, J. A., Silverman, B. W., Turner, S. L., & 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>
- Benhamed, S., Guardiola, F. A., Mars, M., & Esteban, M. Á.** (2014). Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes. *Veterinary Microbiology*, *171*(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.008>.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A.** (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *61*(2), 160–174. <https://doi.org/10.1159/000342079>.
- Bertotto, D., Poltronieri, C., Negrato, E., Majolini, D., Radaelli, G., & Simontacchi, C.** (2010). Alternative matrices for cortisol measurement in fish. *Aquaculture Research*, *41*(8), 1261–1267. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02417>.
- Binuramesh, C., & Michael, R. D.** (2011). Diel variations in the selected serum immune parameters in *Oreochromis mossambicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, *30*(3), 824–829. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.01.004>.

- Bogwald, J.; Dalmo, R. A.** (2015). Gastrointestinal pathogenesis proofs: Gastrointestinal pathogenesis in aquatic animals. *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, (June), 53–74.
- Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., ... 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>.
- Bolnick, D. I., Snowberg, L. K., Hirsch, P. E., Lauber, C. L., Knight, R., Caporaso, J. G., & Svanbäck, R.** (2014). Individuals' diet diversity influences gut microbial diversity in two freshwater fish (threespine stickleback and Eurasian perch). *Ecology Letters*, 17(8), 979–987. <https://doi.org/10.1111/ele.12301>.
- Boutin, S., Bernatchez, L., Audet, C., & Derôme, N.** (2013). Network analysis highlights complex interactions between pathogen, host and commensal microbiota. *PLoS ONE*, 8(12), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084772>.
- Boutin, S., Sauvage, C., Bernatchez, L., Audet, C., & Derome, N.** (2014). Inter individual variations of the fish skin microbiota: Host genetics basis of mutualism? *PLoS ONE*, 9(7), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102649>.
- Bowman, J. P.** (2007). Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Marine Drugs*, 5, 220–241.
- Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *European Food Research & Technology*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.03.004>.
- Brugman, S., Ikeda-Ohtsubo, W., Braber, S., Folkerts, G., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M.** (2018). A comparative review on microbiota manipulation: lessons from fish, plants, livestock, and human research. *Frontiers in Nutrition*, 5(September), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00080>.
- Butt, R. L., & Volkoff, H.** (2019). Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Frontiers in Endocrinology*, 10(JAN), 6–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00009>.
- Cahill, M.** (1990). Bacterial flora of fishes: A review. *Microbial Ecology*, (19):21-41. Retrieved from www.jstor.org/stable/4251098
- 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>.
- Cao, H., Huang, H., Xu, W., Chen, D., Yu, J., Li, J., & Li, L.** (2011). Fecal metabolome profiling of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma patients by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 691(1–2), 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.038>
- Cao, S., Geng, Y., Yu, Z., Deng, L., Gan, W., Wang, K., ... Lai, W.** (2018). *Acinetobacter lwoffii*, an emerging pathogen for fish in *Schizothorax* genus in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(6), 1816–1822. <https://doi.org/10.1111/tbed.12957>

- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... Knight, R.** (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(SUPPL. 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>.
- Carbajal, A., Reyes-López, F. E., Tallo-Parra, O., Lopez-Bejar, M., & Tort, L.** (2018). Comparative assessment of cortisol in plasma, skin mucus and scales as a measure of the hypothalamic-pituitary-interrenal axis activity in fish. *Aquaculture*, *506*(April), 410–416. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.005>.
- Carda-Diéguez, M., Mira, A., & Fouz, B.** (2014). Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets. *FEMS Microbiology Ecology*, *87*(2), 451–459. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12236>
- Carnevali, O., Avella, M. A., & Gioacchini, G.** (2013). Effects of probiotic administration on zebrafish development and reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, *188*(1), 297–302. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.02.022>.
- Carnevali, Oliana, Maradonna, F., & Gioacchini, G.** (2017). Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture*, *472*, 144–155. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.037>.
- Cebra, J. J.** (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *American Journal of Clinical Nutrition*, *69*(5), 1046–1051. <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.5.1046s>.
- 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), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv061>.
- Chipman, D. M., Sharon, N., Chapman, D. M., & Sharon, N.** (1969). Mechanism of lysozyme action. *American Association for the Advancement of Science*, *165*(3892), 454–465.
- Cho, J. H., Park, I. Y., Kim, M. S., & Kim, S. C.** (2002). Matrix metalloproteinase 2 is involved in the regulation of the antimicrobial peptide parasin I production in catfish skin mucosa. *FEBS Letters*, *531*(3), 459–463. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03584-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03584-6)
- Chrousos, G. P., & Gold, P. W.** (1992). The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, *267*(9), 1244–1252. <https://doi.org/10.1001/jama.1992.03480090092034>.
- Cipriano, R. C., Dove, A., Road, L., Virginia, W., Street, B., & Georgia, A.** (2011). Far from superficial : microbial diversity associated with the skin and mucus of fish. *Bridging America and Russia with Shared Perspectives on Aquatic Animal Health: Proceedings of the Third Bilateral Conference between Russia and the United States, 12-20 July, 2009, Held in Shepherdstown, West Virginia*, 156–167.
- Colwell, R., & Liston, J.** (1962). Bacterial flora of seven species of fish collected at Rongelap and Eniwetok atolls. *Pacific Science*, (1), 264–270.
- Conde-Sieira, M., Chivite, M., Míguez, J. M., & Soengas, J. L.** (2018). Stress effects on the mechanisms regulating appetite in teleost fish. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00631>.

- Conte, F. S.** (2004). Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 86(3–4), 205–223. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.003>.
- Cuesta, A., Meseguer, J., & Esteban, M. A.** (2004). Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 101(3–4), 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.04.021>.
- Cuesta, Alberto, Esteban, M. Á., & Meseguer, J.** (2003). In vitro effect of chitin particles on the innate cellular immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 15(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(02\)00134-1](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(02)00134-1).
- Dalmo, R. A., Ingebrigtsen, K., & Bogwald, J.** (1997). Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases*, 20(4), 241–273. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.00302>.
- Davidson, G. L., Cooke, A. C., Johnson, C. N., & Quinn, J. L.** (2018). The gut microbiome as a driver of individual variation in cognition and functional behaviour. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1756). <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0286>.
- Davis, D. J., Doerr, H. M., Grzelak, A. K., Busi, S. B., Jasarevic, E., Ericsson, A. C., & Bryda, E. C.** (2016). *Lactobacillus plantarum* attenuates anxiety-related behavior and protects against stress-induced dysbiosis in adult zebrafish. *Scientific Reports*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep33726>.
- Dawood, M. A. O., & Koshio, S.** (2016). Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. *Aquaculture*, 454, 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.033>.
- de Bruijn, I., Liu, Y., Wiegertjes, G. F., & Raaijmakers, J. M.** (2018). Exploring fish microbial communities to mitigate emerging diseases in aquaculture. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(1), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix161>.
- De Mercado, E., Larrán, A. M., Pinedo, J., & Tomás-Almenar, C.** (2018). Skin mucous: A new approach to assess stress in rainbow trout. *Aquaculture*, 484, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.031>.
- De Silva, S. S., Francis, D. S., & Tacon, A. G. J.** (2010). Fish oils in aquaculture: In retrospect. *Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds*, 1–20. <https://doi.org/10.1201/9781439808634>.
- Deda, O., Gika, H. G., Wilson, I. D., & Theodoridis, G. A.** (2015). An overview of fecal sample preparation for global metabolic profiling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113, 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.006>.
- Dehler, C. E., Secombes, C. J., & Martin, S. A. M.** (2017). Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 467, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.017>.
- Demers, N. E., & Bayne, C. J.** (1997). The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology*, 21(4), 363–373. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(97\)00009-8](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(97)00009-8)

- 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>.
- Dhabhar, F. S.** (2002). Stress-induced augmentation of immune function—The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain, Behavior, and Immunity*, 16(6), 785–798.
- Dixon, P.** (2003). VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science*, 14(6), 927–930. <https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228>.
- 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>.
- Ellis, A. E.** (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 25(8–9), 827–839. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00038-6).
- Esteban, M.Á.** (2012). An overview of the immunological defenses in fish skin. *ISRN Immunology*, 2012, 1–29. <https://doi.org/10.5402/2012/853470>.
- Esteban, M. Á., & Cerezuela, R.** (2015). Fish mucosal immunity: Skin. In *Mucosal Health in Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00004-2>.
- Estruch, G., Collado, M. C., Peñaranda, D. S., Tomás Vidal, A., Jover Cerdá, M., Pérez Martínez, G., ... 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), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136389>.
- Falk, P. E. R. G., Hooper, L. V, Midtvedt, T., & Gordon, J. I.** (1998). Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62 (4), 1157–1170.
- 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 - A Molecular and 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)
- Fjellheim, A. J., Playfoot, K. J., Skjermo, J., & Vadstein, O.** (2012). Inter-individual variation in the dominant intestinal microbiota of reared Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture Research*, 43(10), 1499–1508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02952>.
- Fontinha, F., Magalhães, R., Moutinho, S., Santos, R., Campos, P., Serra, C. R., ... Peres, H.** (2021). Effect of dietary poultry meal and oil on growth, digestive capacity, and gut microbiota of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 530, 735879. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735879>.
- Food Agriculture Organization (FAO).** (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture. Retrieved from <https://www.fao.org/documents/card/es/c/ca9229en/>

- Forsatkar, M. N., Nematollahi, M. A., Rafiee, G., Farahmand, H., & Lawrence, C. (2017). Effects of the prebiotic mannan-oligosaccharide on the stress response of feed deprived zebrafish (*Danio rerio*). *Physiology and Behavior*, 180 (August), 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.08.010>.
- Fouz, B., Larsen, J., Nielsen, B., Barja, J., & Toranzo, A. (1992). Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12(January), 155–166. <https://doi.org/10.3354/dao012155>.
- Fraher, M. H., O'Toole, P. W., & Quigley, E. M. M. (2012). Techniques used to characterize the gut microbiota: A guide for the clinician. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 9(6), 312–322. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.44>.
- Gajardo, K., Rodiles, A., Kortner, T. M., Krogdahl, Å., Bakke, A. M., Merrifield, D. L., & Sørum, H. (2016). A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): A basis for comparative gut microbial research. *Scientific Reports*, 6(April), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep30893>.
- Galindo-Villegas, J., Garcíá-Moreno, D., De Oliveira, S., Meseguer, J., & Mulero, V. (2012). Regulation of immunity and disease resistance by commensal microbes and chromatin modifications during zebrafish development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(39). <https://doi.org/10.1073/pnas.1209920109>.
- Ganguly, S., & Prasad, A. (2012). Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22(1), 11–16. <https://doi.org/10.1007/s11160-011-9214-x>.
- 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>.
- Ghimire, G. P., Thuan, N. H., Koirala, N., & Sohng, J. K. (2015). Advances in biochemistry and microbial production of squalene and its derivatives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 441–451. <https://doi.org/10.4014/jmb.1510.10039>.
- Ghosh, S., Sinha, A., & Sahu, C. (2007). Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research*, 38(5), 518–526. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01696>.
- Gomez-Gil, B., Fajer-Avila, E., & García-Vargas, F. (2007). *Vibrios* of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869 from northwestern Mexico. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1518–1526. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03199>.
- Gomez, D., Sunyer, J. O., & Salinas, I. (2013). The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish and Shellfish Immunology*, 35(6), 1729–1739. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.032>.
- Gómez, G. D., & Balcázar, J. L. (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52(2), 145–154. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00343>.
- Gram, L., & Ringø, E. (2005). Chapter 17: Prospects of fish probiotics. *Biology of Growing Animals*, 2(C), 379–417. [https://doi.org/10.1016/S1877-1823\(09\)70050-5](https://doi.org/10.1016/S1877-1823(09)70050-5).

- 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 and Shellfish Immunology*, 87(February), 744–754. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.015>
- Guardiola, F. A., Cuesta, A., Arizcun, M., Meseguer, J., & Esteban, M. A.** (2014). Comparative skin mucus and serum humoral defence mechanisms in the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish and Shellfish Immunology*, 36(2), 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.01.001>.
- Guardiola, F. A., Cuesta, A., & Esteban, M. A.** (2016). Using skin mucus to evaluate stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 59, 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.005>.
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., ... Birren, B. W.** (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research*, 21(3), 494–504. <https://doi.org/10.1101/gr.112730.110>.
- Hacquard, S., Garrido-Oter, R., González, A., Spaepen, S., Ackermann, G., Lebeis, S., ... Schulze-Lefert, P.** (2015). Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. *Cell Host and Microbe*, 17(5), 603–616. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.009>.
- Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y., & Hoshino, T.** (2004). Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture*, 234(1–4), 335–346. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.018>.
- Hanif, A., Bakopoulos, V., & Dimitriadis, G. J.** (2004). Maternal transfer of humoral specific and non-specific immune parameters to sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Fish and Shellfish Immunology*, 17(5), 411–435. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.04.013>.
- Hansen, G. H., Strom, E., & Olafsen, J. A.** (1992). Effect of different holding regimens on the intestinal microflora of herring (*Clupea harengus*) larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (2), 461–470. <https://doi.org/10.1128/aem.58.2.461-470.1992>.
- Hansen, G. H., & Olafsen, J. A.** (1999). Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology*, 38(1), 1–26. <https://doi.org/10.1007/s002489900158>.
- Harrison F.C.** (1929). The discoloration of halibut. *Can. J. Res.*, (1): 214-239.
- Hartley, B. B. S.** (1960). Proteolytic Enzymes. *Annual Reviews*.
- Harwati, T. U., Kasai, Y., Kodama, Y., Susilaningih, D., & Watanabe, K.** (2009). *Tropicibacter naphthalenivorans* gen. nov., sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Semarang Port in Indonesia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(2), 392–396. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65821-0>
- Head, I. M., Saunders, J. R., & Pickup, R. W.** (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 35(1), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s002489900056>.
- Hjelmeland, K., Christie, M., & Raa, J.** (1983). Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. *Journal of Fish Biology*, 23(1), 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1983.tb02878>.

- Horsley, R. W. (1977). A review of the bacterial flora of teleosts and elasmobranchs, including methods for its analysis. *Journal of Fish Biology*, 10(6), 529–553. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04086>.
- Hoseinifar, S. H., Roosta, Z., Hajimoradloo, A., & Vakili, F. (2015). The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). *Fish and Shellfish Immunology*, 42(2), 533–538. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.003>.
- Hosoya, S., Johnson, S. C., Iwama, G. K., Gamperl, A. K., & Afonso, L. O. B. (2007). Changes in free and total plasma cortisol levels in juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) exposed to long-term handling stress. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 146(1), 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.09.003>.
- Hovda, M. B., Fontanillas, R., Mcgurk, C., Obach, A., & Rosnes, J. T. (2012). Seasonal variations in the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*, 43(1), 154–159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02805>.
- Ikeda-Ohtsubo, W., Brugman, S., Warden, C. H., Rebel, J. M. J., Folkerts, G., & Pieterse, C. M. J. (2018). How can we define “optimal microbiota?”: A comparative review of structure and functions of microbiota of animals, fish, and plants in agriculture. *Frontiers in Nutrition*, 5(October), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00090>.
- Ina-Salwany, M. Y., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F. A., Mohd-Aris, A., Amal, M. N. A., ... 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>.
- Iwama, G. K. (2007). The welfare of fish. In *Diseases of Aquatic Organisms* (Vol. 75). <https://doi.org/10.3354/dao075155>.
- Izvekova, G. I., Izvekov, E. I., & Plotnikov, A. O. (2007). Symbiotic microflora in fishes of different ecological groups. *Biology Bulletin*, 34(6), 610–618. <https://doi.org/10.1134/S106235900706012X>.
- Izvekova, G. I., & Lapteva, N. A. (2004). Microflora associated with the digestive-transport surfaces of fish and their parasitic cestodes. *Russian Journal of Ecology*, 35(3), 176–180. <https://doi.org/10.1023/B:RUSE.0000025968.97632.30>.
- Johnson, K. V. A., & Foster, K. R. (2018). Why does the microbiome affect behaviour? *Nature Reviews Microbiology*, 16(10), 647–655. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0014-3>.
- Kanchanopas-Barnette, P., Labella, A., Alonso, C. M., Manchado, M., Castro, D., & Borrego, J. J. (2009). The first isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from Asian seabass *Lates calcarifer*. *Fish Pathology*, 44(1), 47–50. <https://doi.org/10.3147/jsfp.44.47>.
- 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), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00559>.

- Kim, D. H., Brunt, J., & Austin, B.** (2007). Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1654–1664. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03185.x>
- Klesius, P. H., Shoemaker, C. A., & Evans, J. J.** (2008). *Flavobacterium columnare* chemotaxis to channel catfish mucus. *FEMS Microbiology Letters*, 288(2), 216–220. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01348>.
- Kormas, K. A., Meziti, A., Mente, E., & Frentzos, A.** (2014). Dietary differences are reflected on the gut prokaryotic community structure of wild and commercially reared sea bream (*Sparus aurata*). *MicrobiologyOpen*, 3(5), 718–728. <https://doi.org/10.1002/mbo3.202>.
- Lai, K. P., Lin, X., Tam, N., Ho, J. C. H., Wong, M. K. S., Gu, J., ... Tse, W. K. F.** (2020). Osmotic stress induces gut microbiota community shift in fish. *Environmental Microbiology*, 22(9), 3784–3802. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15150>.
- 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>.
- Larsen, A. M., Mohammed, H. H., & Arias, C. R.** (2014). Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. *Journal of Applied Microbiology*, 116(6), 1396–1404. <https://doi.org/10.1111/jam.12475>.
- Larsen, A., Tao, Z., Bullard, S. A., & Arias, C. R.** (2013). Diversity of the skin microbiota of fishes: Evidence for host species specificity. *FEMS Microbiology Ecology*, 85(3), 483–494. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12136>.
- Larsen, M. H., Larsen, J. L., & Olsen, J. E.** (2001). Chemotaxis of *Vibrio anguillarum* to fish mucus: Role of the origin of the fish mucus, the fish species and the serogroup of the pathogen. *FEMS Microbiology Ecology*, 38(1), 77–80. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(01\)00170-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00170-2).
- Leal, E., Fernández-Durán, B., Guillot, R., Ríos, D., & Cerdá-Reverter, J. M.** (2011). Stress-induced effects on feeding behavior and growth performance of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A self-feeding approach. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 181(8), 1035–1044. <https://doi.org/10.1007/s00360-011-0585-z>.
- Legendre, P., Borcard, D., & Peres-Neto, P. R.** (2005). Concepts & synthesis emphasizing new ideas to stimulate research in ecology analyzing beta diversity: Partitioning the spatial variation of community composition data. *Ecological Monographs*, 75(4), 435–450.
- Legrand, T. P. R. A., Catalano, S. R., Wos-Oxley, M. L., Stephens, F., Landos, M., Bansemer, M. S., ... 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), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02664>.
- Li, J., Ni, J., Li, J., Wang, C., Li, X., Wu, S., ... Yan, Q.** (2014). Comparative study on gastrointestinal microbiota of eight fish species with different feeding habits. *Journal of Applied Microbiology*, 117(6), 1750–1760. <https://doi.org/10.1111/jam.12663>.

- Li, Jie, Cao, J., Wang, X., Liu, N., Wang, W., & Luo, Y.** (2017). *Acinetobacter pittii*, an emerging new multi-drug resistant fish pathogen isolated from diseased blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) in China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(16), 6459–6471. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8392-4>.
- Li, Jie, Tang, L., Li, S., Li, G., & Mo, Z.** (2020). The efficacy and side-effects of oil-based adjuvants emulsified *Vibrio anguillarum* bivalent inactivated vaccine in turbot (*Scophthalmus maximus*) under production mode. *Aquaculture*, 524(March), 735259. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735259>.
- Li, Xian, Deng, Y., Li, X., Ma, X., Wang, J., & Li, J.** (2020). Integration of marine macroalgae (*Chaetomorpha maxima*) with a moving bed bioreactor for nutrient removal from maricultural wastewater. *Archaea*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8848120>.
- Li, Xuemei, Yan, Q., Xie, S., Hu, W., Yu, Y., & Hu, Z.** (2013). Gut microbiota contributes to the growth of fast-growing transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064577>.
- Li, Xuemei, Yu, Y., Feng, W., Yan, Q., & Gong, Y.** (2012). Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae. *Journal of Microbiology*, 50(1), 29–37. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1340-1>.
- Limsuwan, T., & Lovell, R. T.** (1981). Intestinal synthesis and absorption of vitamin B-12 in channel catfish. *Journal of Nutrition*, 111(12), 2125–2132. <https://doi.org/10.1093/jn/111.12.2125>.
- Lin, W., Li, L., Chen, J., Li, D., Hou, J., Guo, H., & Shen, J.** (2018). Long-term crowding stress causes compromised nonspecific immunity and increases apoptosis of spleen in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish and Shellfish Immunology*, 80, 540–545. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.050>.
- 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(March), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep24340>.
- Llewellyn, M. S., Leadbeater, S., Garcia, C., Sylvain, F. E., Custodio, M., Ang, K. P., ... Derome, N.** (2017). Parasitism perturbs the mucosal microbiome of Atlantic Salmon. *Scientific Reports*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep43465>.
- Llewellyn, M. S., Boutin, S., Hoseinifar, S. H., & Derome, N.** (2014). Teleost microbiomes: The state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Frontiers in Microbiology*, 5(JUN), 1–1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00207>.
- Llewellyn, M. S., McGinnity, P., Dionne, M., Letourneau, J., Thonier, F., Carvalho, G. R., ... Derome, N.** (2016). The biogeography of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) gut microbiome. *ISME Journal*, 10(5), 1280–1284. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.189>.
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., & Huttenhower, C.** (2016). The healthy human microbiome. *Genome Medicine*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0307-y>.
- López, J. R., Diéguez, A. L., Doce, A., de la Roca, E., de la Herran, R., Navas, J. I., ... Romalde, J. L.** (2012). *Pseudomonas baetica* sp. nov., a fish pathogen isolated from wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(4), 874–882. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.030601-0>.

- 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>.
- Lucena, T., Pujalte, J., Ruvira, A., Garay, E., Arahál, D. R., & Macia, M. C.** (2012). *Tropicibacter multivorans* sp. nov., an aerobic alphaproteobacterium isolated from surface seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *62*, 844–848. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.030973-0>.
- MacDonald, N. L., Stark, J. R., & Austin, B.** (1986). Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Dover sole (*Solea solea* L.), with emphasis on the possible role of bacteria in the nutrition of the host. *FEMS Microbiology Letters*, *35*(1), 107–111. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01508>.
- Malick, R. C., Bera, A. K., Chowdhury, H., Bhattacharya, M., Abdulla, T., Swain, H. S., ... Das, B. K.** (2020). Identification and pathogenicity study of emerging fish pathogens *Acinetobacter junii* and *Acinetobacter pittii* recovered from a disease outbreak in *Labeo catla* (Hamilton, 1822) and *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844) of freshwater wetland in . *Aquaculture Research*, *51*(6), 2410–2420. <https://doi.org/10.1111/are.14584>.
- Mao, S., Zhang, M., Liu, J., & Zhu, W.** (2015). Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: Membership and potential function. *Scientific Reports*, *5*(October), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep16116>.
- Margolis, L.** (1953). The effect of fasting on the bacterial flora of the intestine of fish. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, *10* (2), 62–63. <https://doi.org/10.1139/f53-003>.
- Marques, A., Ollevier, F., Verstraete, W., Sorgeloos, P., & Bossier, P.** (2006). Gnotobiotically grown aquatic animals: Opportunities to investigate host-microbe interactions. *Journal of Applied Microbiology*, *100*(5), 903–918. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02961>.
- Martin-Antonio, B., Manchado, M., Infante, C., Zerolo, R., Labella, A., Alonso, C., & Borrego, J. J.** (2007). Intestinal microbiota variation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) under different feeding regimes. *Aquaculture Research*, *38*(11), 1213–1222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01790>.
- 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>.
- Maule, A. G., & Schreck, C. B.** (1991). Stress and cortisol treatment changed affinity and number of glucocorticoid receptors in leukocytes and gill of coho salmon. *General and Comparative Endocrinology*, *84*(1), 83–93. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(91\)90067-G](https://doi.org/10.1016/0016-6480(91)90067-G).
- Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D., & Weaver, C. T.** (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, *489*(7415), 231–241. <https://doi.org/10.1038/nature11551>.
- 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>.

- Mekuchi, M., Asakura, T., Sakata, K., Yamaguchi, T., Teruya, K., & Kikuchi, J.** (2018). Intestinal microbiota composition is altered according to nutritional biorhythms in the leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus*). *PLoS ONE*, *13*(6), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197256>.
- Merrifield, D. L., Harper, G. M., Mustafa, S., Carnevali, O., Picchiatti, S., & Davies, S. J.** (2011). Effect of dietary alginic acid on juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) intestinal microbial balance, intestinal histology and growth performance. *Cell and Tissue Research*, *344*(1), 135–146. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1125-y>.
- Merrifield, D. L., & Rodiles, A.** (2015). The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. In *Mucosal Health in Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00010-8>.
- Milligan, C. L., & Girard, S. S.** (1993). Lactate metabolism in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, *180*(1), 175–193. <https://doi.org/10.1242/jeb.180.1.175>,
- Miyake, S., Soh, M., Azman, M. N., Ngoh, S. Y., Orbán, L., & Seedorf, H.** (2020). Insights into the microbiome of farmed Asian sea bass (*Lates calcarifer*) with symptoms of tenacibaculosis and description of *Tenacibaculum singaporense* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *113*(6), 737–752. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01391-9>.
- Mohamad, N., Amal, M. N. A., Yasin, I. S. M., Zamri Saad, M., Nasruddin, N. S., Al-saari, N., ... Sawabe, T.** (2019). Vibriosis in cultured marine fishes: a review. *Aquaculture*, *512*(July). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734289>.
- Molinari, L. M., De Oliveira Scoaris, D., Pedroso, R. B., De Lucas Rodrigues Bittencourt, N., Nakamura, C. V., Ueda-Nakamura, T., ... Dias Filho, B. P.** (2003). Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in a semi-intensive system. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, *25*(2), 267–271. <https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v25i2.2007>.
- Mudarris, M., & Austin, B.** (1988). Quantitative and qualitative studies of the bacterial microflora of turbot, *Scophthalmus maximus* L., gills. *Journal of Fish Biology*, *32*(2), 223–229. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1988.tb05355>.
- Mugnier, C., Fostier, A., Guezou, S., Gaignon, J. L., & Quemener, L.** (1998). Effect of some repetitive factors on turbot stress response. *Aquaculture International*, *6* (1), 33–45. <https://doi.org/10.1023/A:1009217719227>.
- Muyzer, G., & Ramsing, N. B.** (1995). Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Water Science & Technology*, *32* (8) 1–9.
- Naeem, S., & Li, S.** (1997). Biodiversity enhances ecosystem reliability. *Nature*, *390*(6659), 507–509. <https://doi.org/10.1038/37348>.
- Navarrete, P., Espejo, R. T., & Romero, J.** (2009). Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Microbial Ecology*, *57*(3), 550–561. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9448-x>.
- 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>.

- Nedoluha, P. C., & Westhoff, D.** (1997). Microbiology of striped bass grown in three aquaculture systems. *Food Microbiology*, *14*(3), 255–264. <https://doi.org/10.1006/fmic.1996.0095>.
- Neuman, C., Hatje, E., Zarkasi, K. Z., Smullen, R., Bowman, J. P., & Katouli, M.** (2016). The effect of diet and environmental temperature on the faecal microbiota of farmed Tasmanian Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*, *47*(2), 660–672. <https://doi.org/10.1111/are.12522>.
- Noga, E. J.** (2000). Skin ulcers in fish: Pfiesteria and other etiologies. *Toxicologic Pathology*, *28*(6), 807–823. <https://doi.org/10.1177/019262330002800607>.
- Novriadi, R.** (2016). Vibriosis in aquaculture. *Omni-Akuatika*, *12*(1), 1–12. <https://doi.org/10.20884/1.oa.2016.12.1.24>
- O'Hara, A. M., & Shanahan, F.** (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, *7*(7), 688–693. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>.
- Olafsen, J. A.** (2001). Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, *200*(1–2), 223–247. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00702-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00702-5).
- Olsson, J. C., Westerdahl, A., Conway, P. L., & Kjelleberg, S.** (1992). Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*)- and dab (*Limanda limanda*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(2), 551–556. <https://doi.org/10.1128/aem.58.2.551-556.1992>.
- Opiyo, M. A., Marijani, E., Muendo, P., Odede, R., Leschen, W., & Charo-Karisa, H.** (2018). A review of aquaculture production and health management practices of farmed fish in Kenya. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, *6*(2), 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.07.001>.
- Ortuño, J., Esteban, M. A., & Meseguer, J.** (2002). Lack of effect of combining different stressors on innate immune responses of seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *84*(1–2), 17–27. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00387-7](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00387-7).
- Parisi, M. G., Benenati, G., & Cammarata, M.** (2015). Sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) bacterial infection and confinement stress acts on F-type lectin (DIFBL) serum modulation. *Journal of Fish Diseases*, *38*(11), 967–976. <https://doi.org/10.1111/jfd.12309>.
- Parra, D., Reyes-Lopez, F. E., & Tort, L.** (2015). Mucosal immunity and B cells in teleosts: Effect of vaccination and stress. *Frontiers in Immunology*, *6*(JUN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00354>.
- Parry, R. M., Chandan, R. C., & Shahani, K. M.** (1965). A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *119*(2), 384–386. <https://doi.org/10.3181/00379727-119-30188>.
- Pemberton, J. M., Kidd, S. P., & Schmidt, R.** (1997). Secreted enzymes of aeromonas. *FEMS Microbiology Letters*, *152*(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00186-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00186-9).

- Peñaranda, D. S., Bäuerl, C., Tomás-Vidal, A., Jover-Cerdá, M., Estruch, G., Pérez Martínez, G., & Martínez Llorens, S. (2020). Intestinal explant cultures from gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) allowed the determination of mucosal sensitivity to bacterial pathogens and the impact of a plant protein diet. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21207584>.
- Peng, L. H., Liang, X., Xu, J. K., Dobretsov, S., & Yang, J. L. (2020). Monospecific biofilms of *Pseudoalteromonas* promote larval settlement and metamorphosis of *Mytilus coruscus*. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59506-1>.
- Perez-Pascual, D., Vendrell-Fernandez, S., Audrain, B., Bernal-Bayard, J., Patiño-Navarrete, R., Petit, V., ... Ghigo, J. M. (2021). Gnotobiotic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) model reveals endogenous bacteria that protect against *Flavobacterium columnare* infection. *PLoS Pathogens*, 17(1), 1–21. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009302>.
- Pérez-Sánchez, J., Terova, G., Simó-Mirabet, P., Rimoldi, S., Folkedal, O., Calduch-Giner, J. A., ... Sitjà-Bobadilla, A. (2017). Skin mucus of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). protein mapping and regulation in chronically stressed fish. *Frontiers in Physiology*, 8(February), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00034>.
- 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), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00922-w>.
- Pimentel, T., Marcelino, J., Ricardo, F., Soares, A. M. V. M., & Calado, R. (2017). Bacterial communities 16S rDNA fingerprinting as a potential tracing tool for cultured seabass *Dicentrarchus labrax*. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11552-y>.
- Pottinger, T. G. (1998). Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in anglers' keepnets. *Journal of Fish Biology*, 53(4), 728–742. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb01828>.
- Prakash, S., Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., & Cantor, A. (2011). The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/981214>.
- Pridgeon, J. W., & Klesius, P. H. (2012). Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 7(048). <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20127048>.
- Pulkkinen, K., Suomalainen, L. R., Read, A. F., Ebert, D., Rintamäki, P., & Valtonen, E. T. (2010). Intensive fish farming and the evolution of pathogen virulence: The case of columnaris disease in Finland. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1681), 593–600. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1659>.
- Qi, X. Z., Xue, M. Y., Yang, S. B., Zha, J. W., Wang, G. X., & Ling, F. (2017). Ammonia exposure alters the expression of immune-related and antioxidant enzymes-related genes and the gut microbial community of crucian carp (*Carassius auratus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 70, 485–492. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.043>.

- Quade, M. J., & Roth, J. A.** (1997). A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 58(3–4), 239–248. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(97\)00048-2](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(97)00048-2).
- 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).
- Raposo De Magalhães, C., Schrama, D., Farinha, A. P., Revets, D., Kuehn, A., Planchon, S., ... Cerqueira, M.** (2020). Protein changes as robust signatures of fish chronic stress: A proteomics approach to fish welfare research. *BMC Genomics*, 21(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6728-4>.
- Rawls, J. F., Samuel, B. S., & Gordon, J. I.** (2004). Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), 4596–4601. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400706101>.
- Rawn, D. F. K., Krakalovich, T., Forsyth, D. S., & Roscoe, V.** (2009). Analysis of fin and non-fin fish products for azamethiphos and dichlorvos residues from the Canadian retail market. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(8), 1510–1516. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01678>.
- Ray, A. K., Ghosh, K., & Ringø.** (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture nutrition*, 18, 465–492. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00943>.
- Reed, G. B., & Spence, C. M.** (1929). The intestinal and slime flora of the haddock: a Preliminary Report. *Contributions to Canadian Biology and Fisheries*, 4(1), 257–264. <https://doi.org/10.1139/f29-019>.
- Reid, K. M., Patel, S., Robinson, A. J., Bu, L., Jarungsriapisit, J., Moore, L. J., & Salinas, I.** (2017). Salmonid alphavirus infection causes skin dysbiosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolts. *PLoS ONE*, 12(3), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172856>.
- Richards, G. P., Watson, M. A., Needleman, D. S., Uknalis, J., Boyd, E. F., & Fay, P.** (2017). Mechanisms for *Pseudoalteromonas piscicida*-induced killing of *Vibrios* and other bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(11), 1–17.
- Ringø, E., & Strøm, E.** (1994). Microflora of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. *Aquaculture Research*, 25(6), 623–629. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1994.tb00726>.
- Ringø, E., Strøm, E., & Tabachek, J. A.** (1995). Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture Research*, 26(10), 773–789. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1995.tb00870>.
- Ringø, E., Zhou, Z., Vecino, J. L. G., Wadsworth, S., Romero, J., Krogdahl, ... 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, E., & Holzapfel, W.** (2000). Identification and characterization of carnobacteria associated with the gills of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Systematic and Applied Microbiology*, 23(4), 523–527. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(00\)80026-0](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80026-0).

- Ringø, E., 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 SPEC. ISS.), 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.047>.
- Ringø, E., & Olsen, R. E. (1999). The effect of diet on aerobic bacterial flora associated with intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Journal of Applied Microbiology*, 86(1), 22–28. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00631>.
- Ringø, E., Olsen, R. E., Mayhew, T. M., & Myklebust, R. (2003). Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture*, 227(1–4), 395–415. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.05.001>.
- Ringø, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Refstie, S., & Krogdahl, Å. (2006). Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture*, 261(3), 829–841. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.030>.
- Rodríguez, A., Esteban, M. A., & Meseguer, J. (2003). A mannose-receptor is possibly involved in the phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae* by seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 14(5), 375–388. <https://doi.org/10.1006/fsim.2002.0446>.
- Roeselers, G., Mittge, E. K., Stephens, W. Z., Parichy, D. M., Cavanaugh, C. M., Guillemin, K., & 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>.
- Romano, M. C., Rodas, A. Z., Valdez, R. A., Hernández, S. E., Galindo, F., Canales, D., & Brousset, D. M. (2010). Stress in wildlife species: Noninvasive monitoring of glucocorticoids. *NeuroImmunoModulation*, 17(3), 209–212. <https://doi.org/10.1159/000258726>.
- Romero, J., & Navarrete, P. (2006). 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microbial Ecology*, 51(4), 422–430. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9037-9>.
- Romero, J., Ringø, E., & Merrifield, D. L. (2014). The gut microbiota of fish. *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, 75–100. <https://doi.org/10.1002/9781118897263.ch4>.
- 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). <https://doi.org/10.1186/s42523-020-00072-2>.
- Rosado, D., Pérez-Losada, M., Severino, R., Cable, J., & Xavier, R. (2019). Characterization of the skin and gill microbiomes of the farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*) and seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 500(October 2018), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.063>.
- Ross, N. W., Firth, K. J., Wang, A., Burka, J. F., & Johnson, S. C. (2000). Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Diseases of Aquatic Organisms*, 41(1), 43–51. <https://doi.org/10.3354/dao041043>.
- Sadhu, N., Sharma, S. R. K., Joseph, S., Dube, P., & Philipose, K. K. (2014). Chronic stress due to high stocking density in open sea cage farming induces variation in biochemical and immunological functions in Asian seabass (*Lates calcarifer*, Bloch). *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(4), 1105–1113. <https://doi.org/10.1007/s10695-014-9909-8>.

- Sadovy, Y., Randall, J. E., & Rasotto, M. B.** (2005). Skin structure in six dragonet species (Gobiesociformes; Callionymidae): Interspecific differences in glandular cell types and mucus secretion. *Journal of Fish Biology*, 66(5), 1411–1418. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00692>.
- Salinas, I.** (2015). The mucosal immune system of teleost fish. *Biology*, 4(3), 525–539. <https://doi.org/10.3390/biology4030525>.
- Samaras, A., Santo, C. E., Papandroulakis, N., Mitrizakis, N., Pavlidis, M., Höglund, E., ... Gorissen, M.** (2018). Allostatic load and stress physiology in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Frontiers in Endocrinology*, 9(AUG), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00451>.
- Santos, G. A., Schrama, J. W., Mamaug, R. E. P., Rombout, J. H. W. M., & Verreth, J. A. J.** (2010). Chronic stress impairs performance, energy metabolism and welfare indicators in European seabass (*Dicentrarchus labrax*): The combined effects of fish crowding and water quality deterioration. *Aquaculture*, 299(1–4), 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.018>.
- Saurabh, S., & Sahoo, P. K.** (2008). Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39(3), 223–239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883>.
- Scialò, F., Fernández-Ayala, D. J., & Sanz, A.** (2017). Role of mitochondrial reverse electron transport in ROS signaling: Potential roles in health and disease. *Frontiers in Physiology*, 8(JUN), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00428>.
- Sekirov, I., & Finlay, B. B.** (2009). The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *Journal of Physiology*, 587(17), 4159–4167. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172742>.
- Silva-Carrillo, Y., Hernández, C., Hardy, R. W., González-Rodríguez, B., & Castillo-Vargasmachuca, S.** (2012). The effect of substituting fish meal with soybean meal on growth, feed efficiency, body composition and blood chemistry in juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture*, 364–365, 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.007>.
- Silva, F. C. de P., Nicoli, J. R., Zambonino-Infante, J. L., Kaushik, S., & Gatesoupe, F. J.** (2011). Influence of the diet on the microbial diversity of faecal and gastrointestinal contents in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and intestinal contents in goldfish (*Carassius auratus*). *FEMS Microbiology Ecology*, 78 (2), 285–296. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01155>.
- Skjermo, J., & Vadstein, O.** (1993). Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 255–256(1), 185–191. <https://doi.org/10.1007/BF00025838>.
- Smith, C. J., Danilowicz, B. S., & Meijer, W. G.** (2007). Characterization of the bacterial community associated with the surface and mucus layer of whiting (*Merlangius merlangus*). *FEMS Microbiology Ecology*, 62(1), 90–97. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00369>.
- Standen, B. T., Rodiles, A., Peggs, D. L., Davies, S. J., Santos, G. A., & Merrifield, D. L.** (2015). Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(20), 8403–8417. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6702-2>.

- Stephens, W. Z., Burns, A. R., Stagaman, K., Wong, S., Rawls, J. F., Guillemin, K., & Bohannan, B. J. M.** (2016). The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development. *ISME Journal*, *10*(3), 644–654. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.140>.
- Stevens, M. G., Kehrli, M. E., & Canning, P. C.** (1991). A colorimetric assay for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *28*(1), 45–56. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(91\)90042-B](https://doi.org/10.1016/0165-2427(91)90042-B).
- Stewart, M. M.** (1932). The bacterial flora of the slime and intestinal contents of the haddock (*Gadus aeglefinus*). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *18*(1), 35–50. <https://doi.org/10.1017/S0025315400051286>.
- Subramanian, S., MacKinnon, S. L., & Ross, N. W.** (2007). A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *148*(3), 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.06.003>.
- Sugita, H., Matsuo, N., Hirose, Y., Iwato, M., & Deguchi, Y.** (1997). *Vibrio* sp. strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(12), 4986–4989. <https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4986-4989.1997>.
- Sugita, H., Miyajima, C., & Deguchi, Y.** (1991). The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. *Aquaculture*, *92*(C), 267–276. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90028-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90028-6).
- Sugita, Haruo, Shibuya, K., Shimooka, H., & Deguchi, Y.** (1996). Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture*, *145*(1–4), 195–203. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01319-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01319-1).
- Sullam, K. E., Essinger, S. D., Lozupone, C. A., O'Connor, M. P., Rosen, G. L., Knight, R., ... 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>.
- Sunyer, J. O., Gómez, E., Tort, L., Navarro, V., & Quesada, J.** (1995). Physiological responses and depression of humoral components of the immune system in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) following daily acute stress. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *52*(11), 2339–2346. <https://doi.org/10.1139/f95-826>.
- Sylvain, F. É., Cheaib, B., Llewellyn, M., Gabriel Correia, T., Barros Fagundes, D., Luis Val, A., & Derome, N.** (2016). PH drop impacts differentially skin and gut microbiota of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Scientific Reports*, *6*(July), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep32032>.
- Tacchi, L., Lowrey, L., Musharrafieh, R., Crossey, K., Larragoite, E. T., & Salinas, I.** (2015). Effects of transportation stress and addition of salt to transport water on the skin mucosal homeostasis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, *435*, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.027>.

- Tacchi, L., Musharrafieh, R., Larragoite, E. T., Crossey, K., Erhardt, E. B., Martin, S. A. M., ... Salinas, I.** (2014). Nasal immunity is an ancient arm of the mucosal immune system of vertebrates. *Nature Communications*, 5(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms6205>.
- Tanasomwang, V., & Muroga, K.** (1988). Intestinal microflora of larval and juvenile stages in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Pathology*, 23(2), 77–83. <https://doi.org/10.3147/jsfp.23.77>.
- Tang, B. L., Yang, J., Chen, X. L., Wang, P., Zhao, H. L., Su, H. N., ... Zhang, Y. Z.** (2020). A predator-prey interaction between a marine *Pseudoalteromonas* sp. and Gram-positive bacteria. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14133-x>.
- Tapia-Paniagua, S. T., 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 and Shellfish Immunology*, 75(October 2017), 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.006>.
- Tapia-Paniagua, S. T., 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>.
- Teixeira-de Mello, F., Meerhoff, M., Baattrup-Pedersen, A., Maigaard, T., Kristensen, P. B., Andersen, T. K., ... Jeppesen, E.** (2012). Community structure of fish in lowland streams differ substantially between subtropical and temperate climates. *Hydrobiologia*, 684(1), 143–160. <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0979-7>.
- Toranzo, A. E., Magariños, B., & Romalde, J. L.** (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246(1–4), 37–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.002>.
- Tort, L.** (2011). Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(12), 1366–1375. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>.
- Trust, T. J.** (1975). Bacteria associated with the gills of salmonid fishes in freshwater. *Journal of Applied Bacteriology*, 38(3), 225–233. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1975.tb00527>.
- Tveterås S., Asche F., Bellemare M.F., Smith M.D., Guttormsen A.G., y col.** (2012) Fish Is Food - The FAO's Fish Price Index. *PLoS ONE* 7(5): e36731. doi:10.1371/journal.pone.0036731.
- Uchii, K., Matsui, K., Yonekura, R., Tani, K., Kenzaka, T., Nasu, M., & Kawabata, Z.** (2006). Genetic and physiological characterization of the intestinal bacterial microbiota of bluegill (*Lepomis macrochirus*) with three different feeding habits. *Microbial Ecology*, 51(3), 277–284. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9018-z>.
- Valenzuela, C. A., Zuloaga, R., Mercado, L., Einarsdottir, I. E., Björnsson, B. T., Valdés, J. A., & Molina, A.** (2018). Chronic stress inhibits growth and induces proteolytic mechanisms through two different nonoverlapping pathways in the skeletal muscle of a teleost fish. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 314(1), R102–R113. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00009.2017>.

- Van Kessel, M. A. H. J., Dutilh, B. E., Neveling, K., Kwint, M. P., Veltman, J. A., Flik, G., ... Op den Camp, H. J. M.** (2011). Pyrosequencing of 16s rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.). *AMB Express*, *1*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-41>.
- Van Rheeën, P. F., Van De Vijver, E., & Fidler, V.** (2010). Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: Diagnostic meta-analysis. *BMJ (Online)*, *341*(7765), 188. <https://doi.org/10.1136/bmj.c3369>.
- Vaseeharan, B., & Thaya, R.** (2014). Medicinal plant derivatives as immunostimulants: An alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquaculture International*, *22*(3), 1079–1091. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9729-3>.
- Vatsos, I. N.** (2017). Standardizing the microbiota of fish used in research. *Laboratory Animals*, *51*(4), 353–364. <https://doi.org/10.1177/0023677216678825>.
- Vazzana, M., Cammarata, M., Cooper, E. L., & Parrinello, N.** (2002). Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture*, *210*(1–4), 231–243. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00818-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00818-3).
- Vendramin, N., Zrncic, S., Padrós, F., Oraic, D., Le Breton, A., Zarza, C., & Olesen, N. J.** (2016). Fish health in Mediterranean Aquaculture, past mistakes and future challenges. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, *36*(1), 38–45.
- Wang, K., Liu, L., He, Y., Qu, C., & Miao, J.** (2021). Effects of dietary supplementation with κ -Selenocarrageenan on the selenium accumulation and intestinal microbiota of the sea cucumbers *Apostichopus japonicus*. *Biological Trace Element Research*, *199*, 2753–2763.
- Wang, H., Wang, C., Tang, Y., Sun, B., Huang, J., & Song, X.** (2018) *Pseudoalteromonas* probiotics as potential biocontrol agents improve the survival of *Penaeus vannamei* challenged with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, *49*, 30–36.
- Ward, N. L., Steven, B., Penn, K., Methé, B. A., & Detrich, W. H.** (2009). Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish species. *Extremophiles*, *13*(4), 679–685. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0252-4>.
- Wasana, W.P., Senevirathne, A., Nikapitiya, C., Eom T-Y., Lee, Y., Lee, J-S., Kang, D-H., Oh, C., & De Zoysa, M.** (2021). A novel *Pseudoalteromonas* xiamenensis marine isolate as a potential probiotic: anti-inflammatory and innate immune modulatory effects against thermal and pathogenic stresses. *Marine drugs*, *19*, 707.
- Webster, T. M., Rodriguez-Barreto, D., Consuegra, S., & Garcia de Leaniz, C.** (2020). Cortisol-related signatures of stress in the fish microbiome. *Frontiers in Microbiology*, *11*(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01621>.
- Wells, R. M. G., & Pankhurst, N. W.** (1999). Evaluation of simple instruments for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein as stress indicators in fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, *30*(2), 276–284. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1999.tb00876>.
- Wendelaar Bonga, S.E.** (1997) The stress response in fish. *Physiological Reviews*, *77* (3).

- Wilson, J. M., & Laurent, P.** (2002). Fish gill morphology: Inside out. *Journal of Experimental Zoology*, 293(3), 192–213. <https://doi.org/10.1002/jez.10124>.
- Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., ... Boon, N.** (2009). Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature*, 458(7238), 623–626. <https://doi.org/10.1038/nature07840>.
- Woese, C. R.** (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), 221–271. <https://doi.org/10.1139/m88-093>.
- Wong, S., Waldrop, T., Summerfelt, S., Davidson, J., Barrows, F., Kenney, B. B., ... Good, C.** (2013). Aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess a large core intestinal microbiota that is resistant to variation in diet and rearing density. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), 4974–4984. <https://doi.org/10.1128/AEM.00924-13>.
- Xia, J. H., Lin, G., Fu, G. H., Wan, Z. Y., Lee, M., Wang, L., ... Yue, G. H.** (2014). The intestinal microbiome of fish under starvation. *BMC Genomics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-266>.
- Xiao Joe, J. T., Tseng, Y., Wu, J., & Lu, M.** (2021). The alteration of intestinal microbiota profile and immune response in *Epinephelus coioides* during pathogen infection. *Life*, 11(99).
- Xu, Z., Parra, D., Gómez, D., Salinas, I., Zhang, Y. A., Von Gersdorff Jørgensen, L., ... Oriol Sunyer, J.** (2013). Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(32), 13097–13102. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304319110>.
- Yin, Z., Lam, T. J., & Sin, Y. M.** (1995). The effects of crowding stress on the non-specific immuneresponse in fancy carp (*Cyprinus carpio* L). *Fish and Shellfish Immunology*, 5(7), 519–529. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(95\)80052-2](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(95)80052-2).
- Yoon, J., Matsuo, Y., Matsuda, S., Adachi, K., Kasai, H., & Yokota, A.** (2007). *Rubritalea spongiae* sp. nov. and *Rubritalea tangerina* sp. nov., two carotenoid- and squalene-producing marine bacteria of the family Verrucomicrobiaceae within the phylum Verrucomicrobia, isolated from marine animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(10), 2337–2343. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65243-0>.
- Yoon, J., Matsuo, Y., Matsuda, S., Adachi, K., Kasai, H., & Yokota, A.** (2008). *Rubritalea sabuli* sp. nov., a carotenoid- and squalene-producing member of the family Verrucomicrobiaceae, isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(4), 992–997. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65540-0>.
- Zarkasi, K. Z., Abell, G. C. J., Taylor, R. S., Neuman, C., Hatje, E., Tamplin, M. L., ... Bowman, J. P.** (2014). Pyrosequencing-based characterization of gastrointestinal bacteria of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) within a commercial mariculture system. *Journal of Applied Microbiology*, 117(1), 18–27. <https://doi.org/10.1111/jam.12514>.
- Zhang, M., Sun, Y., Liu, Y., Qiao, F., Chen, L., Liu, W. T., ... Li, E.** (2016). Response of gut microbiota to salinity change in two euryhaline aquatic animals with reverse salinity preference. *Aquaculture*, 454, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.014>.

- Zhang, X.-H., He, X., & Austin, B.** (2020). *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *Marine Life Science & Technology*, 2(3), 231–245. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00037-z>.
- Zhang, X., Ding, L., Yu, Y., Kong, W., Yin, Y., Huang, Z., ... Xu, Z.** (2018). The change of teleost skin commensal microbiota is associated with skin mucosal transcriptomic responses during parasitic infection by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Frontiers in Immunology*, 9(December), 2972. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02972>.
- Zhang, Y. A., Salinas, I., & Oriol Sunyer, J.** (2011). Recent findings on the structure and function of teleost IgT. *Fish and Shellfish Immunology*, 31(5), 627–634. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.03.021>.
- Zhou, X., Ren, W., Zhou, X., Ren, W., Bharath, S. R., Tang, X., ... Liu, Z.** (2016). Structural and functional insights into the unwinding mechanism of *Bacteroides* sp Pif1. *Cel lReports*, 14(8), 2030–2039. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.008>.