

Análisis de la microbiota de branquias de *Sparus aurata* tras la inclusión de la microalga *Nannochloropsis gaditana* en la dieta

Belén Delgado-Martín¹, Isabel M. Cerezo¹, Rocío Bautista¹, Marta Domínguez², Jorge García², M. Isabel Sáez³, Juan Antonio Martos-Sitcha⁴ y Silvana T. Tapia²

¹Unidad de Bioinformática – SCBI, Universidad de Málaga, belendm@uma.es; ²Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga; ³Departamento de Biología y Geología, Universidad de Almería; ⁴Departamento de Biología, Universidad de Cádiz

Línea temática (y, en su caso, sub-área): El Mar como Fuente de Recursos

Modalidad de participación: Póster

Abstract

The inclusion of microalgae in the diet of farmed fish such as sea bream (*Sparus aurata*) is proposed as a sustainable alternative to the traditional diet with fishmeal, since numerous benefits have been reported to the fish. The gills act as the first defence barrier against pathogenic organisms and have an autochthonous microbiota that contributes to this function, in the fact that it is important to know if diets supplemented with microalgae can cause any alteration. In this work, three diets (control, raw *Nannochloropsis gaditana* seaweed and hydrolyzed seaweed) were fed to juvenile sea bream for 90 days, later they were sacrificed and their organs frozen. 16S rRNA was sequenced on an Illumina® platform and bioinformatic analysis with MOTHUR was performed. A significant increase in the richness index (Chao1) was shown in the microbiota of the gills of the fish fed *N. gaditana*. The most significant changes occurred in the fish fed the raw algae, with a notable increase in the genus *Shewanella* in this group.

Palabras clave: acuicultura, microbiota, branquias, dorada, microalgas

Introducción

La dorada (*Sparus aurata*) es una especie de gran interés económico en la acuicultura, especialmente en los países mediterráneos. Actualmente, se utiliza una gran cantidad de harina de pescado para alimentar a estos animales hasta obtener un tamaño comercial. En la búsqueda de alternativas más sostenibles, se propone la inclusión de microalgas en las dietas. *Nannochloropsis gaditana* es una microalga con una composición alta en lípidos beneficiosos (Riveros et al., 2018). La importancia de las dietas en la acuicultura no es solo a nivel nutricional, sino que también pueden aumentar la resistencia a las infecciones. En este contexto, las branquias presentan una barrera de interacción entre el pez con su entorno acuoso. Además de ser el órgano encargado de la respiración, posee funciones de protección y reguladoras, y actúa como primera línea de defensa frente a patógenos. Las branquias están recubiertas por una secreción de moco que alberga microbiota autóctona y componentes moleculares del sistema inmunitario. Por ello, el objetivo de este trabajo es estudiar el efecto sobre la microbiota de las branquias de *S. aurata* de talla comercial de la inclusión de la microalga *N. gaditana* al pienso mediante tecnologías NGS.

Material y métodos

La biomasa de *N. gaditana* se produjo en fotobiorreactores tubulares cerrados en la Estación Experimental de las Palmerillas de la Fundación Cajamar siguiendo un procedimiento estándar. Las dietas utilizadas para este trabajo fueron: i) control: dieta Control; ii) Cruda: microalgas crudas añadidas al 5% iii) Hidrolizada: hidrolizado de microalgas liofilizado añadido al 5%. Las algas frescas se hidrolizaron utilizando enzimas comerciales con actividad celulasa (Vizcozyme®). El ensayo de alimentación se desarrolló en las instalaciones del Servicio Central de Investigación en Cultivos Marinos de la Universidad de Cádiz, donde los ejemplares juveniles de *S. aurata* de tamaño comercial se dividieron en tanques y se alimentaron durante 90 días. Posteriormente, los animales se sacrificaron y los órganos se congelaron a -80°C hasta su uso. El ADN del contenido intestinal fue extraído con el método de Martínez et al., (1998). El ARNr 16S de las muestras se secuenciaron utilizando la plataforma Illumina® NextSeq 550 (Illumina, San Diego, CA, EE.

UU.) mediante secuenciación por pares (2 × 300 pb) en el Servicio de Ultrasecuenciación del Centro de Bioinnovación de la Universidad de Málaga (Málaga, España). El procesamiento de los datos se realizó bioinformáticamente mediante un flujo de trabajo basado en el software MOTHUR (v1.39.5). Los resultados se consideraron significativos entre índices de diversidad alfa cuando $p < 0,05$ (t-Student); mientras que la comparación taxonómica se realizó utilizando DESeq2 (R), con $p < 0,05$.

Resultados y discusión

El análisis de las secuencias mostró un total de 2.498.287 lecturas, que clusterizaron en 370 OTU tras la normalización al número de lecturas mínimas al que se asintotizaron las curvas de rarefacción (32.991). La inclusión de *N. gaditana* en las dietas de dorada mostró un aumento significativo en el índice de riqueza (Chao1). Los índices de diversidad y dominancia (Shannon y Simpson) no mostraron diferencias significativas entre tratamientos (tabla 1).

Tabla 1. Cálculo de los índices de alfa diversidad por tratamiento

	Chao1	Shannon	Simpson
Control	81,45 ± 11,50	2,49 ± 0,60	0,81 ± 0,14
Hidrolizada	100,33 ± 14,46*	2,70 ± 0,57	0,83 ± 0,10
Cruda	113,32 ± 23,34*	2,52 ± 0,49	0,76 ± 0,13

Valores expresados como media ± desviación típica, (n=6). * indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

A nivel taxonómico, todas las muestras presentaron como filo predominante el filo Proteobacteria, seguido de Bacteroidetes, Actinobacteria y Firmicutes, siendo este último significativamente superior en la dieta Cruda. A nivel de familia, *Moraxellaceae* y *Flavobacterias*, seguidos de *Francisellaceae* y *Pseudomonadaceae*, fueron comunes en todos los tratamientos. Respecto al estudio de los géneros presentes en las branquias de *S. aurata*, *Actinobacter*, *Polaribacter*, *Pseudomonadaceae* y *Streptococcus* fueron los más representados en todas las muestras. *Shewanella* fue significativamente más abundante en la dieta cruda (23%), con respecto a los otros tratamientos (0-2%). Además, OTU con abundancias menores al 1% mostraron diferencias significativas, como el caso del filotipo *Vibrionaceae* unclassified presente en el control con respecto a la dieta Cruda, el género *Fingoldia* que fue significativamente inferior en el control con respecto a las dietas con inclusión de microalga, o los géneros *Edaphobacter*, *Aquicella*, *Vigibacillus* que se mostraron significativos en la dieta hidrolizada con respecto al control.

Conclusiones

La inclusión del 5% de *N. gaditana* en el pienso de *S. aurata* hasta alcanzar el tamaño comercial produjo cambios a nivel de la microbiota asociada a las mucosas de las branquias, siendo las muestras de los animales alimentados con un 5% de microalga cruda aquellos que más variaron. Son necesarios estudios complementarios para conocer los beneficios de la inclusión del alga en la dieta.

Bibliografía

Riveros, K., Sepulveda, C., Bazaes, J., Marticorena, P., Riquelme, C., & Acién, G. (2018). Overall development of a bioprocess for the outdoor production of *Nannochloropsis gaditana* for aquaculture. *Aquaculture Research*, 49(1), 165-176.

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.

Agradecimientos

Este proyecto ha sido financiado por la fundación CEIMAR a través del “Proyecto de Jóvenes Investigadores (CEIJ-C05.3)” y con el apoyo de la spin-off LifeBioencapsulation S.L.