



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DEL
LENGUADO SENEGALES (*Solea senegalensis*) BAJO UN
ESQUEMA DE ALIMENTACIÓN SUPLEMENTADO CON
VITAMINA K1 (FILOQUINONA)

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

Marcos Iván Acosta Fernández

La Paz, Baja California Sur, noviembre de 2021.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 14:00 horas del día 23 del Mes de Noviembre del 2021, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DEL LENGUADO SENEGALÉS (*Solea senegalensis*) BAJO UN ESQUEMA DE ALIMENTACIÓN SUPLEMENTADO CON VITAMINA K1 (FILOQUINONA)"

Presentada por el alumno:

Marcos Iván Acosta Fernández

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **ACUICULTURA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.



LA COMISIÓN REVISORA

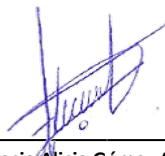


Dr. Daríel Tovar Ramírez
Co-Director de Tesis

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Co-Director de Tesis



Dr. Ignacio Fernández Mozón
Co-Tutor de Tesis



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y Formación de
Recursos Humanos.

La Paz, Baja California Sur, a 23 de noviembre de 2021.

Los miembros del comité de tesis del estudiante Marcos Iván Acosta Fernández del Programa de Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el VoBo dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Citas y bibliografía
- Porcentajes de similitud:
7% de similitud
Se muestra captura de pantalla



Reporte de similitud de iThenticate para el documento "NEGALÉS". El informe muestra un porcentaje de similitud del 7% (SIMILAR) considerando citas y bibliografía. A continuación se detallan los siete puntos de coincidencia:

Match	Source	Words	Similarity
1	Internet	72 words es.wikipedia.org	1%
2	Internet	72 words crawled on 10-Dec-2017 riuma.uma.es	1%
3	Internet	41 words crawled on 02-Nov-2021 revistabiociencias.uan.edu.mx	<1%
4	Internet	36 words crawled on 11-Apr-2021 www.ulpgc.es	<1%
5	Crossref	33 words Ignacio Fernández, Jorge M.O. Fernandes, Vânia P. Roberto, Martina Kopp et al. "Circulating small non-coding RNAs	<1%
6	Crossref Posted Content	30 words Miguel Torres Rodríguez. "Estudio de los patrones de expresión de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos	<1%
7	Internet	29 words crawled on 15-Jun-2017 www.lajar.cl	<1%

Firmas del comité



Dr. Dariel Tovar Ramírez



Dr. Eduardo Quiroz Guzmán



Dr. Ignacio Fernández Monzón

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Dariel Tovar Ramírez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
CONACyT- Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dr. Ignacio Valentín Fernández Monzón
Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Dr. Dariel Tovar Ramírez
Dr. Ignacio Valentín Fernández Monzón

Jurado de Examen

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Dr. Dariel Tovar Ramírez
Dr. Ignacio Valentín Fernández Monzón

Suplente

Dr. Alberto Peña Rodríguez

Resumen

La vitamina K es una molécula liposoluble que habitualmente se encuentra en plantas y organismos fotosintéticos en forma de filoquinona (VK1). Hasta ahora, se ha estudiado el efecto de la VK1 sobre procesos biológicos relacionados con el rendimiento larvario, metabolismo óseo y gametogénesis en el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Sin embargo, el rol de esta vitamina en la microbiota intestinal aún no ha sido explorado, lo que puede ampliar la perspectiva de su efecto en peces. En el presente trabajo se caracterizaron las comunidades bacterianas del lenguado senegalés bajo un esquema de alimentación suplementado con filoquinona. Un total de 46 peces juveniles con un peso corporal húmedo medio de 48,3 g fueron alimentados con dos dietas experimentales: alimento comercial sin suplementación de VK1 (CT) y alimento comercial suplementado con 1250 mg kg⁻¹ de VK1 (VK) durante 30 días, además se tomaron muestras de peces al inicio del bioensayo (T0) para comparar los cambios al final del mismo. Se utilizó la secuenciación de amplicones de la región V4 del gen ARNr 16S para estudiar el perfil de las comunidades bacterianas con la plataforma MiSeq, Illumina. Las secuencias fueron procesadas con el software Mothur, obteniendo un total de 278,367 lecturas clasificadas taxonómicamente. Se identificaron 35,705 unidades taxonómicas operativas (OTUs) que fueron asignadas de manera dominante al phylum Proteobacteria. Las estimaciones de diversidad alfa (Chao y Shannon) fueron superiores en CT en comparación con T0 y VK ($p < 0.05$). El análisis de la diversidad beta no mostró diferencias significativas entre el grupo VK y los grupos T0 y CT ($p > 0.05$). Sin embargo, una exploración con el análisis de componentes principales (PCA) reveló una separación más clara entre CT y VK, donde se identificaron los géneros que explican una mayor diferencia entre estos dos grupos. En general, las muestras de VK mostraron una tendencia a la disminución de la abundancia en los patógenos oportunistas *Vibrio* y *Arcobacter*, así como *Pseudoalteromonas* y miembros de la familia *Rhodobacterace* que particularmente se han asociado al deterioro del estatus de salud de organismos acuáticos. Al considerar una mayor diversidad alfa en CT, se sugiere que la filoquinona podría participar en la respuesta inmune del hospedero al tener un efecto regulatorio en la proliferación de potenciales patógenos, mientras que la mayor diversidad de CT podría estar asociada a un desequilibrio de la microbiota intestinal del lenguado por dichos grupos bacterianos. Los resultados obtenidos contribuyen al entendimiento del efecto de micronutrientes como la vitamina K en la microbiota intestinal del lenguado con potencial de proyección a otros peces teleósteos.

Palabras clave: *Solea senegalensis*, microbiota intestinal, vitamina K.
ORCID:0000-0003-0273-908X



Dr. Dariel Tovar Ramírez
Co-Director de Tesis



Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Co-Director de Tesis

Summary

Vitamin K is a fat-soluble molecule commonly found in plants and photosynthetic organisms in the form of phylloquinone (VK1). The effect of VK1 on biological processes related to larval performance, bone metabolism and gametogenesis has been studied in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). However, the role of this vitamin in the intestinal microbiota has not been explored yet, which may broaden the perspective of its effect in fish. In the present work, the bacterial communities of Senegalese sole were characterized under a feeding scheme supplemented with phylloquinone. A total of 46 juvenile fish with a mean wet body weight of 48.3 g were fed two experimental diets: commercial feed without VK1 supplementation (CT) and commercial feed supplemented with 1250 mg kg⁻¹ VK1 (VK) for 30 days. Fish were also sampled at the beginning of the bioassay (T0) to compare the changes along the trial. Sequencing of amplicons from the V4 region of the 16S rRNA gene was used to study the bacterial community profile with the MiSeq platform, Illumina. The sequences were processed with Mothur software, obtaining a total of 278,367 taxonomically classified reads. A total of 35,705 operational taxonomic units (OTUs) were identified and assigned dominantly to the phylum Proteobacteria. Alpha diversity estimates (Chao and Shannon) were higher in CT compared to T0 and VK ($p < 0.05$). Beta diversity analysis showed no significant differences between VK and T0 and CT groups ($p > 0.05$). However, an exploration of the data with a principal component analysis (PCA) revealed a clearer separation between CT and VK, where genera explaining a greater difference between these two groups were identified. Overall, the VK samples showed a trend of decreasing abundance in the opportunistic pathogens *Vibrio* and *Arcobacter*, as well as *Pseudoalteromonas* and members of the *Rhodobacterace* family that have been associated with deteriorating health status of aquatic organisms. By considering a higher alpha diversity in CT, it is suggested that phylloquinone could participate in the host immune response by having a regulatory effect on the proliferation of potential pathogens, while the higher CT diversity could be associated with an imbalance of the sole gut microbiota by such bacterial groups. The results obtained contribute to the understanding of the effect of micronutrients such as vitamin K on the intestinal microbiota of sole with potential projection to other teleost fish.

Key words: *Solea senegalensis*, intestinal microbiota, vitamin K.

ORCID: 0000-0003-0273-908X



Dr. Dariel Tovar Ramírez
Co-Director de Tesis



Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Co-Director de Tesis

Dedicatoria

A mi familia

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. por las instalaciones, personal administrativo y profesores que fueron parte de mis estudios de Posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (No. de registro 969748).

A mi Comité Tutorial por su tiempo y paciencia. Al Dr. Eduardo Quiroz Guzmán por la atención y la mejor disponibilidad para apoyarme en la realización de este trabajo. Al Dr. Dariel Tovar Ramírez por todo el seguimiento y la disposición para atender cualquier trámite. Al Dr. Ignacio Fernández Monzón por el aprendizaje, las observaciones y en especial por darme la oportunidad de trabajar con las secuencias e información para que este trabajo de tesis fuera posible.

Agradezco a mi familia por acompañarme en este camino. Gracias por todo el amor incondicional, consejos y palabras de ánimo. Es un verdadero privilegio coincidir con ustedes.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	viii
Abreviaturas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Lenguado senegalés	4
2.2 Cultivo del lenguado senegalés	5
2.3 Producción acuícola.....	6
2.4 Límites de producción	7
2.4.1 Malformaciones óseas.....	8
2.4.2 Anomalías en la pigmentación	8
2.4.3 Reproducción	9
2.4.4 Aspectos nutricionales	9
2.4.5 Enfermedades microbiológicas	10
2.5 Vitamina K	10
2.6 Ciclo de la vitamina K	13
2.7 Estudios de VK en lenguado senegalés	15
2.8 Microbiota intestinal	16
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	21
5.1 Objetivo general	21
5.2 Objetivos particulares	21
6. MATERIAL Y METODOS	22
6.1 Obtención y mantenimiento de organismos.....	22
6.2. Elaboración de dietas experimentales	22
6.3. Diseño experimental	23
6.4. Muestreo	23
6.5. Aislamiento, preparación de bibliotecas y secuenciación.....	23
6.6 Análisis bioinformático	24
6.7. Análisis estadístico	25
7. RESULTADOS	26
7.1 Composición de la comunidad bacteriana	26
7.2 Estructura de la comunidad bacteriana	32
8. DISCUSIÓN	35
8.1 Caracterización de las principales bacterias a nivel de phylum y familia	35
8.2 Diversidad alfa y beta	36
8.3 Efecto regulatorio de la filoquinona en la microbiota intestinal del lenguado.....	38
9. CONCLUSIONES	43

10. LITERATURA CITADA.....	44
11. ANEXOS.....	55

Lista de figuras

Figura 1. <i>Solea senegalensis</i> (FishBase, 2021).	4
Figura 2. Distribución geográfica de <i>Solea senegalensis</i> (FishBase, 2021).....	5
Figura 3. Estructuras químicas de la vitamina K (Shearer & Okano, 2018).	11
Figura 4. Ciclo de la vitamina K (Shearer y Okano, 2018). (1) La enzima gamma-carboxiglutamil carboxilasa (GGCX) y el cofactor vitamina K-hidroquinona (VKH ₂) participan en la conversión de glutamato (Glu) a residuos de gamma-carboxiglutamato (Gla). La reacción de gamma-carboxilación da como resultado la generación del metabolito vitamina K 2,3 epóxido (VK>O). (2) VK>O se reduce a VK por el complejo 1 de VK epóxido reductasa (VKORC1) y/o la proteína 1 de tipo VKORC1 (VKORC1L1). La VK es reducida a VKH ₂ por el mismo complejo enzimático (2) y NAD(P)[H] (3).....	14
Figura 5. Medidas de diversidad alfa para las muestras. A) OTUs observados. B) Índice de riqueza de Chao. C) Diversidad de Shannon. Letras diferentes sobre los histogramas en caja indican diferencias significativas entre grupos experimentales (ANOVA; $p < 0.05$, $n=4$).	27
Figura 6. Abundancia relativa de microorganismos en el tracto digestivo de <i>Solea senegalensis</i> (Phylum <i>Proteobacteria</i> dividido a nivel taxonómico de clase).....	28
Figura 7. Abundancia relativa de grupos bacterianos a nivel de familia en el tracto digestivo de <i>Solea senegalensis</i>	29
Figura 8. Abundancia diferencial a nivel de familia en el tracto digestivo de <i>Solea senegalensis</i> . (A) <i>Rhodobacteriaceae</i> (B) <i>Comamonadaceae</i> (C) <i>Nocardiodaceae</i> . Letras diferentes sobre los histogramas en caja indican diferencias significativas entre grupos experimentales (ANOVA; $p \leq 0.05$, $n=4$).....	30
Figura 9. Abundancia relativa de grupos bacterianos a nivel de género en el tracto digestivo de <i>Solea senegalensis</i>	31
Figura 10. Análisis discriminante lineal por efecto del tamaño (<i>LEfse</i>) de las comunidades de microbiota intestinal del lenguado senegalés. El histograma representa los géneros de CT con puntuaciones superiores a 2 (Kruskal Wallis; $p < 0.05$, $n=4$).	32
Figura 11. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la medida de disimilitud de Bray-Curtis. El gráfico representa la distribución de las comunidades bacterianas del intestino de lenguado senegalés con los tres grupos T0, CT y VK. El primer y segundo eje representan el 19.70% y 12.53% de la variación, respectivamente.....	33
Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA) a nivel de género. (A) Gráfico de cargas, representa la distribución de los géneros presentes en los grupos (CT y VK). (B) Gráfico de puntuaciones, representa la dispersión de las muestras de cada grupo (CT y VK). En ambos gráficos, el primer y segundo eje representan el 53.81% y 13.96% de la variación, respectivamente.....	34

Lista de tablas

Tabla 1. Principales enfermedades bacterianas de <i>S. senegalensis</i>	10
Tabla 2. Estudios de la microbiota intestinal de <i>S. senegalensis</i>	18
Tabla 3. Procesamiento de las secuencias obtenidas por muestra.....	26

Abreviaturas

VK	Vitamina K
VK1	Filoquinona
VK2	Menaquinona
VK3	Menadiona
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómal
DDE	Días después de eclosión
ARA	Ácido araquidónico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
G1	Primera generación
VKDPs	Proteínas dependientes de vitamina K
MGP	Proteína de matriz GLA
Oc	Osteocalcina
PRG	Proteína rica en Gla
GAS6	Proteína de detención del crecimiento específico 6
GGCX	Gamma-glutamil carboxilasa
Gla	Ácido gamma-carboxiglutámico
Glu	Ácido glutámico
PXR	Receptor X de pregnano
VKH₂	Vitamina K-hidroquinona
VKO	Vitamina K 2,3 epóxido
VKORC1	Vitamina K epóxido reductasa
VKORC1L1	Proteína 1 de tipo VKORC1
RXR	Receptor X del retinoide
DGGE	Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
AMOVA	Análisis molecular de varianza
ANOVA	Análisis de varianza
OTUs	Unidades taxonómicas operativas
PCoA	Análisis de coordenadas principales
PCA	Análisis de componentes principales
Lefse	Análisis discriminante lineal por efecto de tamaño

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura representa una fuente importante de alimentos para la población humana, contribuyendo significativamente a su bienestar y seguridad alimentaria (FAO, 2020). La producción acuícola ha presentado una tasa de crecimiento anual del 5,3% del 2001 al 2018 y actualmente es considerada la industria con más rápido crecimiento en comparación con otros sectores de producción de alimentos (FAO, 2020). Debido al creciente consumo de pescado per cápita, la diversificación de especies es una de las estrategias para favorecer el crecimiento de esta industria de una manera sostenible. La investigación de recursos con potencial de cultivo y alto valor económico es clave para aumentar las oportunidades de oferta y evitar la saturación del mercado (MARM, 2011).

Muchas especies de peces marinos se cultivan a escala comercial, y entre ellas, el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) reviste particular importancia por la aceptación del consumidor en el mercado europeo y su alto valor económico (APROMAR, 2020). Sin embargo, dentro del cultivo del lenguado, aún existen distintas limitaciones de producción. Satisfacer las demandas nutricionales y fisiológicas del lenguado, para mantener un estado de bienestar óptimo, continúa siendo un problema importante en la industria (Manchado et al., 2016). Otros problemas son la alta incidencia de anomalías esqueléticas, algunos aspectos reproductivos y un desarrollo variable de tallas (Morais et al., 2014).

Respecto a los aspectos nutricionales, se han realizado varios esfuerzos para dilucidar cómo algunos micronutrientes intervienen en las diferentes limitaciones de producción del lenguado senegalés. Se ha encontrado que el estado nutricional de vitamina K (VK) influye en procesos como la gametogénesis, así como en el rendimiento larvario y el desarrollo esquelético (Richard et al., 2014; Fernández et al., 2019). La VK es una vitamina liposoluble necesaria en la dieta de los peces debido a que no son capaces de sintetizarla *de novo*. La VK se clasifica en tres formas, filoquinona (VK1), menaquinona (VK2) y menadiona (VK3). La VK1 y VK2 pueden ser producidas naturalmente en plantas verdes o por microorganismos, respectivamente. La VK3 es sintetizada artificialmente y es frecuentemente usada en la alimentación de animales (y particularmente en peces) en forma de bisulfito de sodio de menadiona (MSB) o bisulfito de nicotinamida de

menadiona (MNB). No obstante, la filoquinona es encontrada de forma predominante en la naturaleza y ha demostrado ser una fuente de VK adecuada en la alimentación de los peces (Udagawa, 2001).

Además de su participación en los procesos de coagulación sanguínea, en los últimos años se ha evidenciado que la VK juega un papel importante en varios procesos biológicos de vertebrados, tales como la formación de los tejidos esqueléticos, la calcificación e inflamación patológicas, homeostasis del sistema redox, metabolismo de esfingolípidos, metabolismo de la glucosa, desarrollo neuronal y capacidades cognitivas (Halder et al., 2019; Beato et al., 2020a; Simes et al., 2020).

A pesar de los importantes avances que se han realizado en la investigación acerca de los procesos en los que interviene la VK en el lenguado senegalés, aún es necesario profundizar más acerca de los requerimientos específicos en cada etapa de crecimiento, así como los cambios que puede producir en el organismo. Específicamente, la inclusión de nuevos ingredientes en la dieta debe evaluarse cuidadosamente, ya que es uno de los principales factores que ejercen una presión selectiva sobre la composición microbiana gastrointestinal en los vertebrados, incluidos los peces (Egerton et al., 2018; Rimoldi et al., 2018).

En los últimos años, las investigaciones sobre la microbiota intestinal han ganado relevancia, pues se ha evidenciado que posee importantes funciones en el metabolismo del huésped, el desarrollo y la maduración de la mucosa, la nutrición, la inmunidad y la resistencia a las enfermedades, además de participar en la síntesis de diversas moléculas de interés fisiológico que pueden representar una fuente de energía para las células epiteliales intestinales (Rimoldi et al., 2018). Estudiar los cambios en las funciones y composición de la microbiota bajo ciertos componentes nutricionales es de vital importancia para comprender cómo la alteración de la microbiota puede influir en el hospedero bajo un régimen alimenticio en particular.

Una de las aproximaciones más eficientes para estudiar el ecosistema microbiano intestinal es representado por las nuevas tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS). Las

técnicas de NGS han evolucionaron, existiendo tecnologías de segunda (454 GS FLX, SOLiD 5500 XL, Illumina GAIIx), tercera (Ion Torrent Proton, CGA, HeliScope) y de cuarta generación (MinION/GridION) (Ku and Roukos, 2013). La caracterización bacteriana por la secuenciación masiva del gen 16s ARNr es una de las estrategias más utilizadas. Recientemente, algunos trabajos han utilizado esta tecnología para investigar la composición y estructura de las comunidades bacterianas de peces como el lenguado senegalés (Carballo et al., 2019; Pinto et al., 2019; Tapia-Paniagua et al., 2019; Domínguez-Maqueda et al., 2021). El conocimiento sobre la microbiota intestinal facilitará el desarrollo de estrategias efectivas para el manejo de nuevos componentes nutricionales con la finalidad de promover la salud y la productividad de los peces. Por lo tanto, el presente estudio se enfoca en evaluar el efecto de la suplementación de VK sobre la microbiota intestinal del lenguado senegalés mediante el análisis de secuenciación masiva de una de las regiones conservadas (la V4) del gen ARNr 16S.

2. ANTECEDENTES

2.1 Lenguado senegalés

El lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858) es un pez plano, teleósteo, del orden *Pleuronectiformes* y de la familia *Soleidae*. Posee un cuerpo ovalado y asimétrico (Fig. 1) que en etapa adulta puede alcanzar entre 45 y 60 cm de longitud (de Azevedo, 2017). Tras la metamorfosis, los dos ojos se sitúan hacia el lado derecho, donde la coloración de la cara ocular es generalmente gris parduzco con pequeñas manchas, mientras que la cara ciega suele ser blanca (de Azevedo, 2017). La aleta pectoral de la cara ocular de *S. senegalensis* es de color negro, lo que la distingue del lenguado común (*S. solea*), que solo posee una mancha negra en el extremo de la aleta (Martínez, 2011).



Figura 1. *Solea senegalensis* (FishBase, 2021).

El *S. senegalensis* se distribuye desde la costa del Atlántico y el Mediterráneo Occidental hasta la costa oeste africana (Fig. 2). Es una especie bentónica que vive en fondos arenosos o fangosos de aguas costeras hasta los 100 metros de profundidad y en lagunas salobres. El lenguado senegalés es una especie que alcanza la madurez sexual a los tres años con un tamaño de 30 centímetros, y no posee caracteres sexuales externos diferenciados. Su principal temporada de desove ocurre durante los meses de marzo a junio (Rodríguez y Peleteiro, 2014), aunque también tiene una segunda temporada de puesta después del verano (Anguis y Cañavate, 2005).

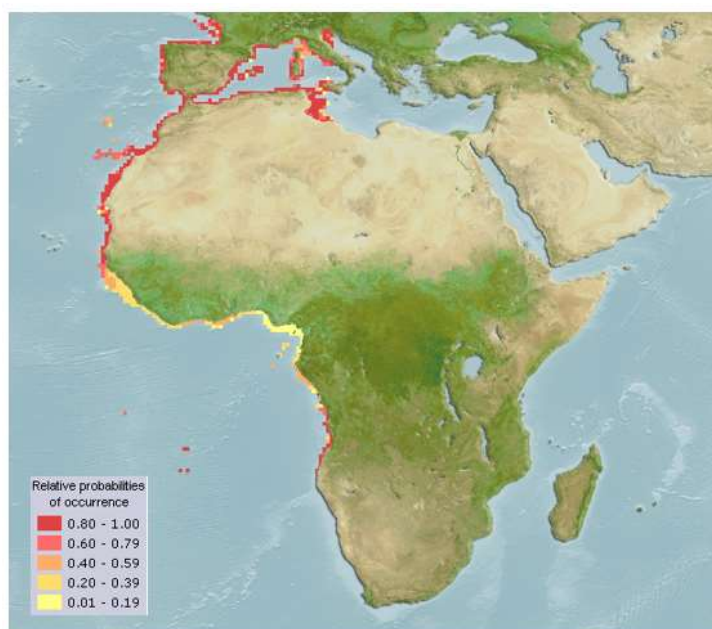


Figura 2. Distribución geográfica de *Solea senegalensis* (FishBase, 2021).

El *S. senegalensis* tiene hábitos de alimentación nocturnos, por lo tanto, dependen en gran medida del olfato y otros estímulos quimiotácticos para el comportamiento de búsqueda de alimentos (Rodríguez y Peleteiro, 2014). En la naturaleza se alimenta preferentemente de pequeños invertebrados bentónicos, larvas de poliquetos (por ejemplo, de *Hediste diversicolor* o *Capitella capitata*), crustáceos (órdenes Tanaidacea, Amphipoda y Decapoda) y moluscos bivalvos. Todas las presas comparten el mismo tipo de hábitat de fondo arenoso y se ha descrito que la edad tiene una influencia importante en el tipo de consumo de presas (Rodríguez y Peleteiro, 2014).

2.2 Cultivo del lenguado senegalés

En general, el cultivo larvario tiene altos índices de supervivencia en comparación con otras especies de peces marinos (Conceição et al., 2007). Su desarrollo comienza con la fecundación del huevo para ser incubados aproximadamente 42 horas a una temperatura de entre 18-20 °C (Sánchez, 2012). Una vez superada la eclosión, las larvas pasan a una fase pelágica hasta el final de la metamorfosis. La metamorfosis ocurre entre los 10-12 hasta 20-30 días después de eclosión (DDE) (Rodríguez y Peleteiro, 2014). En esta etapa las larvas se vuelven gradualmente asimétricas, los órganos internos se reorganizan, y sufren la migración del ojo izquierdo hacia el

lado derecho, cambios que corresponden a la transición de una vida pelágica hacia el asentamiento en los bentos (Sánchez, 2012). Posteriormente, las glándulas gástricas aparecen alrededor de los 27 DDE. A los 31 DDE las larvas de lenguado son capaces de ingerir, digerir y absorber nutrientes de dietas inertes, sin embargo, las principales enzimas pancreáticas e intestinales son eficientes desde las primeras etapas, lo que le permite alimentarse de presas vivas (Ribeiro et al., 1999; Ribeiro et al., 2004). A los 40 días, las larvas miden alrededor de 16 mm y pueden ser transferidas a la zona de criadero que también se denomina nursery (Rodríguez y Peleteiro, 2014). La fase de pre-engorde va de los 5-10 g a 70-100 g aproximadamente, a los 5-6 meses. Finalmente, en la etapa de engorde se pueden alcanzar tallas comerciales (300-350 g) a los 9-10 meses de cultivo (Tapia-Paniagua, 2015).

Los protocolos de alimentación suelen ser muy variables entre los criaderos industriales. Las dietas comerciales se introducen mediante estrategias de co-alimentación y destete (deshabitación alimenticia) entre los 30 y los 60 DDE (Rodríguez y Peleteiro, 2014). Sin embargo, la primera alimentación exógena suele iniciarse con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) enriquecidos con fitoplancton (*Isochrysis galbana*) o productos comerciales, del día 2 DDE hasta 10 DDE. De igual manera, del día 6 hasta 10 DDE se incorpora la alimentación con nauplios de *Artemia*, y posteriormente desde el día 9 DDE se incorporan metanauplios de *Artemia* enriquecidos con microalgas o con productos comerciales hasta el destete total (Rodríguez y Peleteiro, 2014). Aunque se han logrado avances en los últimos años, el alimento artificial para lenguado sigue en constante investigación y desarrollo. Las dietas deben cubrir los requerimientos nutricionales de cada etapa de desarrollo, lo que requiere el uso secuencial de diferentes piensos (Canada et al., 2019).

2.3 Producción acuícola

A menudo suele existir una confusión entre el lenguado senegalés y el lenguado común (*Solea solea*) por su alto grado de parentesco, tanto para los consumidores, como para las estadísticas de producción y mercado (Bjørndal et al., 2016). De cualquier forma, el lenguado senegalés es considerado como una especie atractiva para la diversificación en la acuicultura marina de Europa, ya que es una especie de alto valor, cuyo precio puede encontrarse entre los 17 y 22

euros por Kg (IDAPES, 2021), tiene un amplio mercado y un importante potencial de crecimiento en los próximos años (Bjørndal et al., 2016). Actualmente, toda la producción por acuicultura de estas especies es realizada en la Unión Europea (MAPA, 2017). En 2019, la cosecha mundial de lenguado senegalés procedente de la acuicultura fue de 1.651 toneladas, siendo los principales productores Islandia, Portugal, Francia y España, donde este último aportó 818 toneladas, representando cerca del 50% de la producción total (APROMAR, 2020).

Por otra parte, existe una amplia distribución y variedad de peces planos que también son conocidos de forma genérica como lenguados aunque no pertenezcan a la familia *Soleidae*. El desarrollo del cultivo de estos peces ha ganado interés en los últimos años en el continente americano. En la región norte se han registrado estudios en el lenguado de verano (*Paralichthys dentatus*) (Brown, 2013). En Chile se ha introducido el cultivo de rodaballo (*S. maximus*), el lenguado japonés (*P. olivaceus*) y el halibut o fletán del Atlántico (*H. hippoglossus*) por su potencial a nivel comercial (Alvial y Manríquez, 1999). En México se ha estudiado a las especies *Paralichthys californicus* y *Achirus mazatlanus* que poseen una amplia distribución en la zona del pacífico y son obtenidos mediante captura (Fuentes, 2014; Lucano-Ramírez et al., 2019).

2.4 Límites de producción

A pesar de que se tienen registros del cultivo del lenguado senegalés desde la década de los 80, los cambios más importantes se han evidenciado desde el año 2011, después de lograr controlar algunas de las variables por infección de patógenos (principalmente Tenacibaculosis y Photobacteriosis). Sin embargo, a pesar de que la producción de lenguado senegalés ha evolucionado notablemente, aún existen limitaciones de producción y aspectos específicos en los cuales se puede enfocar la investigación para mejorar la producción. Desde un punto de vista industrial, estas prioridades abarcan temas clave como el control de enfermedades, la calidad de las larvas, así como los avances reproductivos y nutricionales (Howell et al., 2009; de Azevedo, 2017).

2.4.1 Malformaciones óseas

Las deformidades esqueléticas son un factor que puede reducir la productividad y la rentabilidad de la producción intensiva de lenguado senegalés (Koumoundouros, 2010; Morais et al., 2014). La nutrición larvaria durante la pre- y pro-metamorfosis es uno de los parámetros clave que afectan a la esqueletogénesis durante el desarrollo temprano del lenguado (Morais et al., 2014). A corto plazo, estas alteraciones no detectadas podrían representar un problema directo de mercado (Deschamps et al., 2008), pudiendo agravarse durante el crecimiento, volverse aparentes externamente y ocasionar pérdidas económicas (de Azevedo et al., 2017).

Aunque se ha sugerido que esta especie podría ser más propensa a desarrollar deformidades óseas que otras especies, y que los animales deformes pueden sobrevivir aún con estas anomalías sin ser letales (Fernández et al., 2009), para enfrentar este problema los productores optan por selección manual de los especímenes anormales antes de que lleguen al mercado o en la transferencia al engorde de juveniles, lo que también aumenta el personal, los costos, y retrasa el ciclo productivo (Morais et al., 2014; de Azevedo, 2017). En particular, algunos estudios mencionan que la incidencia de deformidades en cultivo puede oscilar entre el 44% (Gavaia et al., 2002) y alrededor del 80% (100% en algunos casos) en las larvas de esta especie (Fernández et al., 2009), mientras que los trastornos que afectan el esqueleto de los especímenes silvestres de *S. senegalensis* son menos frecuentes (19%) (Gavaia et al., 2009).

2.4.2 Anomalías en la pigmentación

Por otra parte, las anomalías de la pigmentación en los peces planos pueden abarcar una amplia gama de afecciones diferentes que van desde el pseudoalbinismo (en el lado ocular), la ambicoloración (pigmentación en los lados ocular y ciego), hiperpigmentación y mosaicismo (Bolker y Hill, 2000; Tagawa y Aritaki, 2005). Aunque estos trastornos son considerados de una etiología compleja, implicando múltiples factores (Pinto et al., 2019), tienden a estar asociados con desequilibrios nutricionales, como un contenido alto de ácido araquidónico (ARA) y una proporción subóptima entre ARA y ácido eicosapentaenoico (EPA) (ARA / EPA) (Villalta et al., 2005). También se conoce que los procesos moleculares y fisiológicos subyacentes en juveniles pueden tener su origen en estadios larvales más tempranos, antes de manifestarse en la

morfología externa. Al igual que las anomalías esqueléticas, este tipo de afecciones modifican el aspecto externo de las especies de peces planos criados, reduciendo el valor de mercado del producto final, aunque su impacto relativo puede depender de la forma en que se comercialicen los peces planos, es decir, intactos o en filetes (Koumoundouros, 2010).

2.4.3 Reproducción

Una limitante importante para el cultivo del lenguado senegalés es la ausencia de desove espontáneo en generaciones de reproductores criados en cautividad desde su nacimiento. Se ha estudiado que los machos G1 no muestran un comportamiento normal de cortejo mientras que las hembras G1 demostraron ser capaces de producir huevos fertilizados a partir del desove natural siempre que estuvieran acompañadas de machos silvestres (Morais et al., 2014). El motivo del fracaso del cortejo y el desove sigue sin estar claro y, en consecuencia, la reproducción del lenguado senegalés cultivado sigue siendo un cuello de botella para establecer una producción industrial sostenible de la especie (Howell et al., 2011). Se estima que varios de los factores que están en el origen de este problema de los reproductores G1 son: el ambiente de cultivo durante las primeras etapas de desarrollo, los efectos de la selección de reproductores en la composición genética de los reproductores y la alimentación (Norambuena et al., 2012).

2.4.4 Aspectos nutricionales

Debido a la alta mortalidad y las bajas tasas de crecimiento, el aspecto nutricional se consideró uno de los principales obstáculos en el cultivo hasta finales de la década de 1990. Aunque se han logrado avances en el establecimiento de protocolos de larvicultura y post-larvas con buen crecimiento y con altas tasas de supervivencia (Morais et al., 2014), aún siguen existiendo oportunidades de mejora para la producción de juveniles de una manera más exitosa. Particularmente, durante el destete se producen tasas de crecimiento variables y gran dispersión de tamaño, que pueden estar relacionados con condiciones de crianza o nutricionales subóptimas durante las primeras etapas de la vida (Morais et al., 2014). Concretamente, es necesario que las microdietas posean varias características estructurales y bioquímicas respecto a la fase de crecimiento de los peces. Aparte de satisfacer los

requerimientos nutricionales y energéticos, las partículas del alimento para larvas deben facilitar la disponibilidad de ingestión debido a la poca capacidad depredadora durante la fase pelágica. Además, es importante optimizar la relación entre la digestibilidad y la retención de micronutrientes solubles en agua en las partículas de menor tamaño (Pinto y Conceição, 2018).

2.4.5 Enfermedades microbiológicas

En general, los peces del género *Solea* cultivados son extremadamente susceptibles a una serie de enfermedades que comúnmente afectan a otras especies de peces planos. En la mayoría de los casos, las enfermedades infecciosas que afectan a la industria piscícola son de carácter oportunista (Tabla 1) y se relacionan con una creciente intensificación de la producción (FAO, 2021). Estos procesos pueden causar importantes pérdidas económicas debido a las altas tasas de mortalidad que se producen y a los costes de los tratamientos (Noga et al., 2011; Tapia-Panigua, 2015). Las soluciones más habituales frente a las infecciones bacterianas implican el uso de antibióticos (Tapia-Paniguagua, 2015).

Tabla 1. Principales enfermedades bacterianas de *S. senegalensis*.

Enfermedad	Microorganismo	Referencia
Tenacibaculosis	<i>Tenacibaculum maritimum</i> <i>T. soleae</i>	Noga, 2010 Fáilde, 2013,
Photobacteriosis	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Noga, 2010
Vibriosis	<i>Vibrio anguillarum</i> , <i>V. harveji</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. pelagius</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>	Arijo et al., 2005 Zorrilla et al., 2003
Aeromoniasis	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	Magariños et al., 2011
Edwardsiellosis	<i>Edwardsiella tarda</i>	Castro et al., 2012

2.5 Vitamina K

El término vitamina K (VK) representa a un grupo de compuestos liposolubles que tienen en común un anillo de 2-metil-1,4-naftoquinona y que difieren en la cadena lateral alifática situada en la posición C-3 (Lambert y De Leenher, 1992). Dependiendo de su fuente, se pueden encontrar tres metabolitos diferentes, distinguiéndose dos formas naturales: la filoquinona

(vitamina K1) y las menaquinonas (vitamina K2) (Beato et al., 2020a) (Fig.3). La filoquinona (2-metil-3-fitil-1,4-naftoquinona) se encuentra en las plantas y tiene la misma cadena lateral de fitilo (C-20) que la clorofila, mientras que las menaquinonas (2-metil-3-multi-prenil-1, 4-naftoquinona) son de origen bacteriano o animal, y generalmente se denotan como MK-n, donde n representa el número de residuos de isoprenilo insaturados, que pueden variar entre 1 y 14 (Schurgers, 2002).

En los organismos que producen VK, ambos tipos están involucrados en los procesos de transporte de electrones: la filoquinona actúa como el cofactor de transferencia de electrones A1 del fotosistema I en las plantas, mientras que la menaquinona juega un papel esencial en varios sistemas microbianos de transporte de electrones. Existe una tercera forma de VK denominada menadiona (vitamina K3), sin embargo, no se produce de forma natural y no tiene actividad por sí misma. Esta forma es un homólogo sintético que no contiene la cadena lateral característica de este tipo de compuestos. Específicamente, la menadiona se considera una provitamina ya que los organismos destino se encargan de convertirla en una forma activa (MK-4 entre otras). La menadiona se utiliza a menudo como suplemento en la alimentación animal. En humanos, ya no se usa debido a sus efectos secundarios tóxicos (Shearer y Okano, 2018).

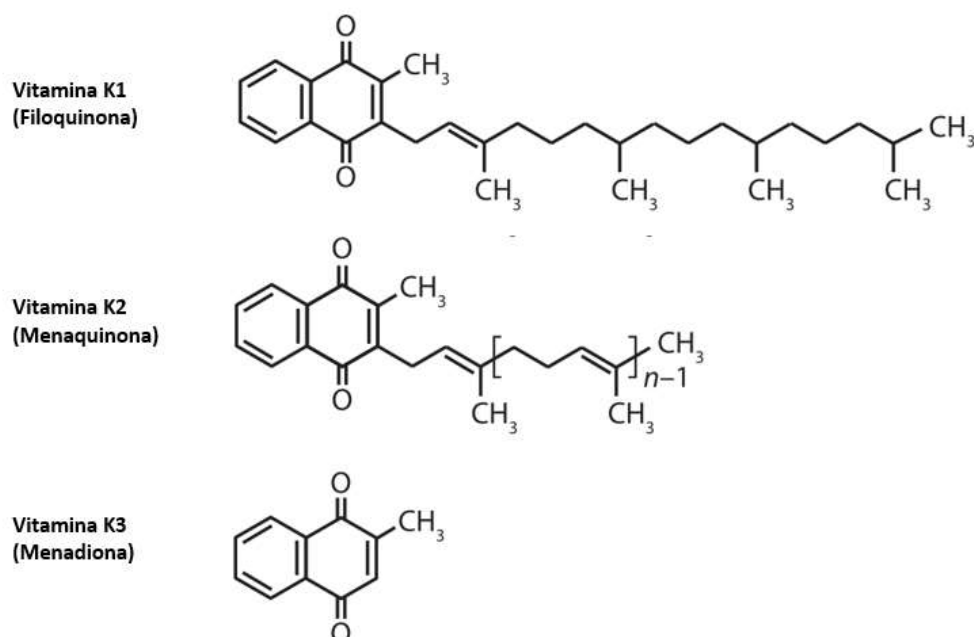


Figura 3. Estructuras químicas de la vitamina K (Shearer & Okano, 2018).

En general, se acepta que en todas las VK, la naftoquinona es el grupo funcional, por lo que el mecanismo de acción es similar para todas estas moléculas. Sin embargo, se pueden esperar diferencias sustanciales con respecto a la absorción intestinal, el transporte, la distribución tisular y la biodisponibilidad. Estas diferencias son causadas por la diferente lipofilia de las diversas cadenas laterales (Halder et al., 2019). Al igual que otras vitaminas liposolubles, la VK ingerida en la dieta es absorbida en el intestino vía sales biliares. Después de la solubilización en gotas lipídicas, la VK se incorpora en micelas compuestas por triacilglicerol, fosfolípidos y ésteres de colesterol. Luego de pasar a los enterocitos, la VK se libera al torrente sanguíneo, a través de la linfa, en los llamados quilomicrones. El mecanismo molecular de la absorción intestinal de VK1 no está definido por completo. Sin embargo, se han identificado tres proteínas de transporte y se sabe que la VK1 se absorbe principalmente en el intestino proximal, mediante un proceso de transporte que requiere energía (Shearer y Okano, 2018).

La VK se identificó por primera vez cuando se observó una tendencia a la hemorragia en pollos alimentados sin esteroides. Dam (1935) encontró que las dietas que contenían hojas verdes y el hígado de cerdo tenían una mejor capacidad de proteger contra este trastorno. Se analizó la fracción lipídica de estas fuentes y se descubrió un nuevo factor antihemorrágico denominado vitamina K ("K" se deriva de la palabra alemana "*koagulation*"). Actualmente, es bien conocido que VK actúa como cofactor en la activación de factores de coagulación dependientes de la VK (Halder et al., 2019).

Durante décadas, se creyó que la única función de la VK estaba en la cascada de la coagulación, sin embargo, en los últimos años se han encontrado evidencias de que varias proteínas dependientes de la VK (VKDPs) tienen otras funciones. Las VKDPs se clasifican en VKDPs hepáticas y extrahepáticas. Las VKDPs hepáticas incluyen factores de coagulación II, VII, IX, X y agentes anticoagulantes naturales (proteína C anticoagulante, proteína S y proteína Z). Las VKDPs extrahepáticas incluyen la proteína de matriz Gla (MGP), la osteocalcina (Oc), la proteína rica en Gla (GRP) y la proteína de detención del crecimiento específico 6 (GAS6). Las VKDPs son modificadas post-transduccionalmente por la acción de la enzima gamma-glutamil carboxilasa (GGCX) que induce una gamma-carboxilación, reacción en la que la VK actúa como co-factor.

Gracias a esa modificación post-transduccional las VKDPs participan en diversos procesos fisiológicos y patológicos (Halder et al., 2019; Beato et al., 2020a).

Actualmente existe evidencia de que la VK participa en la esquetogénesis a través de la osteocalcina (OC) y proteína de matriz Gla (MGP) (Tsugawa y Shiraki, 2020). También, se ha sugerido que la osteocalcina puede intervenir en el metabolismo de la glucosa, estimulando la proliferación de células beta, la secreción de insulina y la sensibilidad a la insulina, al estimular la secreción de adiponectina (Yabanc y Sciences, 2020). Se ha encontrado que la VK posee propiedades antioxidantes (Halder et al., 2019), puede actuar como sustancia reguladora de la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) (Simes et al., 2020), e interviene en los procesos de inflamación, influyendo en la producción de citoquinas proinflamatorias (Simes et al., 2020). Por otra parte, se ha demostrado una correlación directa entre el estatus VK y el deterioro del rendimiento cognitivo y conductual, así como el desarrollo y la supervivencia de las células cerebrales por medio de la síntesis de esfingolípidos y mediante la acción de Gas6 y la proteína S (Simes et al., 2020).

2.6 Ciclo de la vitamina K

Actualmente, Beato et al. (2020a) han revisado las funciones biológicas que la VK puede realizar a través de dos rutas principales: como cofactor de la enzima GGCX y como antagonista del receptor X de pregnano (PXR), el cual controla la transcripción de diferentes genes. La enzima GGCX se encuentra en el retículo endoplasmático y está involucrada en la carboxilación post-transduccional de residuos de glutamato (Glu) en γ -carboxiglutamato (Gla) de las VKDPs (Halder et al., 2019). Este proceso es impulsado por la oxidación de vitamina K-hidroquinona (VKH₂) a vitamina K 2,3 epóxido (VK>O) en una reacción dependiente de dióxido de carbono y oxígeno. Posterior a la reacción de carboxilación, la vitamina K 2,3-epóxido (KO) es reciclada a sus formas de quinona (K) y KH₂ mediante el complejo 1 de VK epóxido reductasa (VKORC1) y en menor medida por la proteína 1 de tipo VKORC1 (VKORC1L1) en tejidos extrahepáticos (Beato et al., 2020a; Simes et al., 2020) (Fig.4). Por otra parte, la VK puede actuar a nivel transcripcional al transactivar el PXR, conocido principalmente como un regulador del metabolismo de compuestos xenobióticos, del colesterol y los ácidos biliares. El PXR forma un heterotetrámero

con el receptor X del retinoide (RXR) y este último complejo se une a los elementos sensibles RXR-PXR dentro de las regiones promotoras de los genes diana (Beato et al., 2020a).

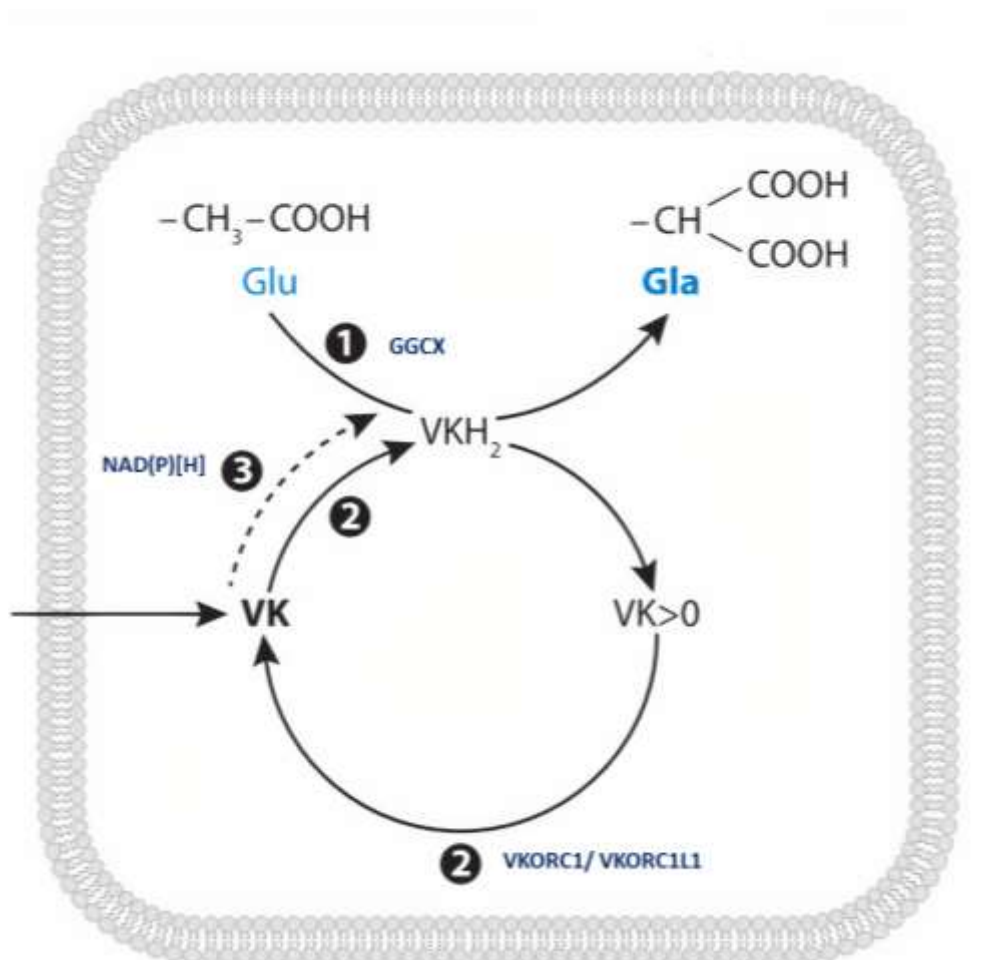


Figura 4. Ciclo de la vitamina K (Shearer y Okano, 2018). (1) La enzima gamma-carboxiglutamil carboxilasa (GGCX) y el cofactor vitamina K-hidroquinona (VKH_2) participan en la conversión de glutamato (Glu) a residuos de gamma-carboxiglutamato (Gla). La reacción de gamma-carboxilación da como resultado la generación del metabolito vitamina K 2,3 epóxido ($\text{VK} > \text{O}$). (2) $\text{VK} > \text{O}$ se reduce a VK por el complejo 1 de VK epóxido reductasa (VKORC1) y/o la proteína 1 de tipo VKORC1 (VKORC1L1). La VK es reducida a VKH_2 por el mismo complejo enzimático (2) y NAD(P)[H] (3).

A nivel transcripcional, los genes implicados en el metabolismo y funciones biológicas de la VK, responden rápidamente a través de vías específicas al estado nutricional en condiciones de ayuno, alimentación o suplementación nutricional, así como otras afecciones, como el tratamiento farmacológico con anticoagulantes en el lenguado senegalés (Beato et al., 2020b). Para cumplir con los requerimientos nutricionales de VK parece necesaria una ingesta equilibrada de VK de diversas fuentes y una microbiota intestinal saludable. Se ha determinado

que los requerimientos nutricionales son ampliamente diferentes entre especies de peces y que pueden ser influenciados por la fuente de VK, así como pueden depender de la etapa de desarrollo en la que se encuentran (Krossøy et al., 2011).

2.7 Estudios de VK en lenguado senegalés

Se han realizado algunos trabajos para conocer el efecto de la VK en *Solea senegalensis*. Por ejemplo, Richard et al. (2014) realizaron un análisis comparativo a nivel transcripcional y proteómico entre una dieta control (dieta sin suplementar el contenido en VK) y unas dietas suplementadas con 50 o 250 mg/Kg de VK1. Se demostró una expresión diferencial de los genes que codifican para proteínas del ciclo de VK (*ggcx* y *vkors*), el receptor nuclear de la VK (*pxr*) y algunas VKDPs (*oc1* y *grp*, particularmente), así como en genes y las proteínas involucradas con procesos biológicos como el desarrollo de la piel, los músculos y huesos. Además, se destacó que uno de los posibles beneficios de aumentar los niveles de VK en dietas para larvas de lenguado senegalés es mejorar el desarrollo esquelético, reduciendo la incidencia de deformidades esqueléticas, pues ligeramente se disminuyó el índice de deformidades, principalmente en la aleta caudal.

Por otra parte, Fernández et al. (2019) estudiaron el papel potencial de la VK1 en la reproducción del lenguado senegalés, evaluando los efectos de la suplementación nutricional de VK1 (1250 mg/kg) durante seis meses. Se encontraron un aumento de los niveles plasmáticos de testosterona en ambos sexos, una mejora de la calidad del esperma al encontrar una menor fragmentación del ADN, además de identificar ARNs no codificantes (ncRNA específicos) expresados diferencialmente en el plasma sanguíneo a través del análisis de RNA-Seq. Beato et al. (2020b) proporcionaron algunas bases moleculares que demuestran cómo el metabolismo de la VK en los peces marinos es sensible a las condiciones nutricionales y ambientales. Al evaluar la expresión génica relativa de los genes que codifican para las enzimas que reciclan la VK (*ssvkorc1* y *ssvkorc1/1*) durante el desarrollo larvario, se determinó que el lenguado podría tener mayores requerimientos de VK en la dieta durante la embriogénesis, pre- y pro-metamorfosis. Además, encontraron que una alimentación de larvas de lenguado senegalés con mayor contenido en VK1 (1250 mg/kg) en un corto plazo (3 días) puede conducir a una mayor

disponibilidad de VK, mientras que en una exposición mayor a 5 días con niveles crecientes de VK se podrían activar algunos procesos regulatorios.

2.8 Microbiota intestinal

El término microbiota se refiere al conjunto de microorganismos que ocupan un ambiente particular o un hospedador (Yukgehnash et al., 2020). Estas comunidades microbianas incluyen microorganismos comensales, simbióticos y patógenos, y son capaces de influir en el sistema inmunológico del organismo huésped, abarcando toda una gama de procesos bioquímicos (Butt y Volkoff, 2019; Yukgehnash et al., 2020). Diversos estudios en humanos y mamíferos han correlacionado las comunidades microbianas intestinales con la fisiología, la nutrición y el crecimiento del huésped, incluso a menudo se considera un "órgano extra", ya que desempeña un papel clave en el metabolismo (Butt & Volkoff, 2019). Principalmente, la microbiota gastrointestinal (GI) de los peces ha sido estudiada para revelar la relación entre patógenos y prevención de enfermedades, así como la relación funcional entre la salud, el efecto sobre la nutrición y la digestión del huésped (Rimoldi et al., 2018).

La colonización microbiana de las larvas de peces se origina en los huevos, el agua circundante y en la primera alimentación (Egerton et al., 2018). Además, dependiendo de la duración de la estancia de las bacterias que residen en el intestino, se denominan microbiota transitoria o residente (Yukgehnash et al., 2020). La microbiota transitoria proviene del mecanismo de ingestión nutricional, donde los microbios que permanecen en los alimentos entran al sistema GI y se albergan durante un tiempo limitado (microbiota transitoria) ya que las cavidades se encuentran rodeadas de microbios adheridos a la pared intestinal. En cambio, la microbiota residente vive en la membrana intestinal del huésped y tiene una relación simbiótica con el (Egerton et al., 2018).

Anteriormente, los estudios de la composición de la microbiota solían evaluarse mediante técnicas que dependen del cultivo, siendo que menos del 1% de la comunidad bacteriana es cultivable (Rimoldi et al., 2018). El inconveniente de tales estudios, especialmente cuando el objetivo es identificar los aislamientos bacterianos, es que el proceso de cultivo lleva tiempo, es

laborioso e identifica solo una fracción limitada de la comunidad bacteriana. Para superar estas barreras, el análisis composicional de la microbiota intestinal se ha llevado a cabo mediante el uso de técnicas moleculares como la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante de reacción en cadena de la polimerasa (PCR-DGGE) y la secuenciación masiva de las regiones menos conservadas o hipervariables del gen 16S ARNr que ayuda a identificar la comunidad microbiana a pesar de su abundancia e incapacidad de cultivo.

Existen varios factores que contribuyen a dar forma a la composición de la microbiota GI, como la especie huésped, los hábitos alimenticios, el nivel trófico y la adición de componentes funcionales (nutracéuticos) (Ringø et al., 2018). En este sentido, es conocido que los componentes nutricionales juegan un papel clave en la construcción de la comunidad microbiana (Ghanbari et al., 2015; Gajardo et al., 2017) . Aunque durante los últimos años se han realizado estudios sobre cómo la vitamina C, la metionina, la valina, el inositol, el ácido pantoténico, la biotina y la tiamina modulan la microbiota intestinal de los peces (Ringø, 2016), las investigaciones que involucran la microbiota del lenguado senegalés se han centrado principalmente en determinar los efectos de la suplementación de probióticos, prebióticos, parabióticos, inmunoestimulantes y/o extractos algales (Tabla 2).

Los estudios se han realizado con diferentes enfoques, sin embargo se ha determinado que la composición general de la microbiota GI de *S. senegalensis* tiene un gran parecido con la de otras especies de peces marinos (Egerton et al. 2018; Domínguez-Maqueda et al., 2021). La exploración de la microbiota GI del lenguado utilizando DGGE y secuenciación masiva del gen 16S ARNr han encontrado a la clase Gamma-Proteobacteria como uno de los constituyentes principales, mientras que a nivel de género *Pseudomonas* y *Vibrio* han sido los géneros encontrados de manera recurrente en organismos juveniles de *S. senegalensis* (Tapia-Paniagua et al., 2014; Vidal et al., 2016; Tapia-Paniagua et al., 2019).

Tabla 2. Estudios de la microbiota intestinal de *S. senegalensis*.

Herramienta de estudio	Región de análisis (16S)	de Tipo de suplementación	de Estadio del organismo	Referencia
Secuenciación de ciclos	NE	Natural alimentación artificial	+ Juvenil	Martin-Antonio et al., 2007
PCR-DGGE	NE	Probióticos <i>Alteromonadaceae</i> (Pdp11 and Pdp13)	Juvenil (10-15g)	Sáenz de Rodrigáñez et al., 2009
PCR-DGGE	V6-V8	Probióticos con alginato de sodio	Juvenil (10g)	Tapia-paniagua et al., 2010
PCR-DGGE	V6-V8	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	Larva	Lobo et al., 2014a
PCR-DGGE	V6-V8	<i>S. putrefaciens</i> Pdp11	Larva	Lobo, et al., 2014b
PCR-DGGE	V6-V8	<i>S. putrefaciens</i> Pdp11	Juvenil (14.6g)	Tapia-Paniagua et al., 2014
PCR-DGGE	V6-V8	Ingredientes de plantas e inmunoestimulantes	NE	Batista et al., 2016
PCR-DGGE	NE	Prebióticos y <i>S. putrefaciens</i> CECT 7627	<i>S.</i> Juvenil (26g)	Vidal et al., 2016
Secuenciación masiva (Illumina MiSeq)	V3-V4	Beta-glucanos de levaduras y extractos microalgales	Juvenil (19g)	Carballo et al., 2019
Secuenciación masiva (Illumina MiSeq)	V3-V4	Dieta suplementada con <i>Ulva ohnoi</i> (alga)	Juvenil	Tapia-Paniagua et al., 2019
Secuenciación masiva (Illumina MiSeq)	V3-V4	Probiótico inactivado por calor (<i>Shewanella putrefaciens</i>)	Juvenil	Domínguez-Maqueda et al., 2021

*NE = No especificado.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se considera que el cultivo de *Solea senegalensis* tiene un gran potencial de aprovechamiento para la diversificación y explotación en la acuicultura. Ampliar los conocimientos sobre la naturaleza del lenguado senegalés es esencial para contribuir al crecimiento de su producción. Aunque previamente se ha evidenciado que la VK interviene en procesos fisiológicos como el metabolismo óseo y procesos reproductivos en esta especie, su efecto sobre la microbiota intestinal aún no ha sido estudiado en peces. Teniendo en cuenta que la alimentación es uno de los principales factores que influyen en la composición de la microbiota intestinal y que los microorganismos que la componen tienen un papel sustancial en el metabolismo, el sistema inmune y el mantenimiento de la salud del hospedador, se vuelve fundamental explorar la influencia de este micronutriente para ampliar el conocimiento del efecto que puede ejercer en peces teleósteos como el lenguado senegalés.

4. HIPÓTESIS

La suplementación de VK1 (filoquinona) en el alimento de juveniles de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) modificará la composición de las comunidades bacterianas presentes en el intestino, y su impacto será evidenciado mediante la tecnología de secuenciación masiva de la región V4 del gen 16S ARN ribosomal y análisis bioinformático.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la suplementación con vitamina K1 en la dieta del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) sobre la microbiota intestinal.

5.2 Objetivos particulares

Caracterizar las comunidades bacterianas del tracto digestivo de juveniles del lenguado senegalés mediante la secuenciación masiva de la región V4 del gen 16S ARNr y análisis bioinformático.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Obtención y mantenimiento de organismos

En el presente estudio se utilizaron huevos de lenguado senegalés obtenidos a partir del desove natural de reproductores en la Estación de Investigación de Acuicultura de EPPO / IPMA (Olhão, Portugal). Los huevos fueron transferidos a las instalaciones de peces del Centro de Ciencias do Mar (CCMAR) - Universidad del Algarve (Faro, Portugal) para su aclimatación térmica, lumínica y química. Posteriormente, se incubaron en un sistema de recirculación de agua semicerrado equipado con filtros mecánicos y biológicos, skimmer de proteínas y esterilizador UV.

Después de la eclosión, las larvas se distribuyeron al azar en cuatro tanques cilíndrico-cónicos blancos de 100 L con una densidad de 95 larvas L⁻¹. A los 19 días (DDE), las postlarvas se transfirieron a bandejas de plástico de fondo plano de 3 litros (120 organismos por bandeja). Los parámetros ambientales fueron los siguientes: 19,9 ± 1,2 °C, 36,9 ± 1,2 g de salinidad L⁻¹, 97,6 ± 4,9% de saturación de oxígeno disuelto, 12 h de luz: 12 h de fotoperíodo oscuro y 900 lux de intensidad de luz en la superficie del agua.

Durante esta etapa las larvas fueron alimentadas progresivamente tres veces al día con presas vivas: rotíferos (*Brachionus rotundiformis*) de 2 a 10 DDE, nauplios de *Artemia* (cepa AF; Salt Lake) del día 6 al 10 DDE y metanauplios de *Artemia* (cepa EG; Salt Lake) enriquecidos con Red Pepper™ (Bernaqua, Bélgica) de 9 a 17 DDE. Los mismos metanauplios de *Artemia*, pero inmediatamente congelados después del enriquecimiento se proporcionaron a las larvas desde los 18 DDE hasta los 30 DDE. Las larvas fueron sometidas a co-alimentación progresiva hasta su deshabitación alimenticia y posteriormente hasta los cinco meses fueron alimentadas con una dieta inerte diseñada específicamente para el lenguado senegalés por Sparos Lda (<http://www.sparos.pt/index.php/en/>; Olhão, Portugal).

6.2. Elaboración de dietas experimentales

La empresa Sparos Lda desarrolló dos piensos semisecos isolipídicos e isonitrógenos con la misma composición proximal de proteína bruta (62,9%), grasa bruta (14,8%), fibra bruta (1,1%),

ceniza bruta (10,2%) y contenido total de fósforo (1,5%). Se elaboraron dos tratamientos: a) Control sin suplementación de VK1 (CT) y b) alimento comercial suplementado con 1250 mg kg⁻¹ de VK1 (VK). Los valores nominales del contenido de VK1 en los piensos formulados se confirmaron mediante HPLC con análisis de detección de fluorescencia (Silliker-Mérieux NutriSciences, Francia; <https://www.merieuxnutrisciences.com/es/en>; Vila Nova de Gaia, Portugal).

6.3. Diseño experimental

Bajo las condiciones de crianza descritas anteriormente, un total de 46 peces juveniles con un peso corporal húmedo medio de 48,3 g se distribuyeron aleatoriamente en dos tanques (23 cada uno) unidos a un pequeño sistema RAS. Los peces fueron alimentados con las dos dietas experimentales (CT y VK) durante 30 días con un 3% de la ingesta diaria de alimento. Previamente, se tomaron muestras de peces al inicio del bioensayo (T0) y al final del mismo (CT y VK) para comparar los cambios sufridos. Las concentraciones de amonio y nitrito en agua se monitorearon diariamente para mantenerlas por debajo de los valores tóxicos.

6.4. Muestreo

Se tomaron muestras para obtener cuatro replicas al comienzo del experimento (T0) y cuatro de cada grupo experimental (CT y VK) al final del ensayo (30 días). Los organismos fueron sacrificados previamente con una sobredosis de metanosulfonato de triclaína (MS-222, Sigma-Aldrich, Madrid, España). Posteriormente se pesaron y se diseccionó su intestino para obtener su microbiota. Las muestras fueron almacenadas en etanol al 100% a -80 °C hasta que se procesó para la preparación y secuenciación de la biblioteca de ADN.

6.5. Aislamiento, preparación de bibliotecas y secuenciación

Para estudiar el impacto de la vitamina K1 en la microbiota del lenguado senegalés se usaron las muestras de intestino para extraer un total de 12 muestras de ADN. La preparación de bibliotecas se realizó utilizando mediante la amplificación de las regiones V4 del gen 16S ARNr con el conjunto de cebadores 515F (5' GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3 ') y 806R (5'

GGACTACHVGGG TWTCTAAT-3') siguiendo el método descrito por Apprill et al. (2015). El tamaño, la pureza y la concentración de las bibliotecas se evaluaron mediante el análisis ScreenTape de alta sensibilidad D1000 (Agilent). Siguiendo las pautas del fabricante, las bibliotecas normalizadas se agruparon y los amplicones (pares de extremos: 300 × 300 pb) se secuenciaron en MR DNA (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, EE. UU.) con la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq.

6.6 Análisis bioinformático

Las secuencias Fastq se procesaron con el software Mothur (The University of Michigan; Ann Arbor, MI, USA) según lo recomendado por Kozich et al. (2013). Brevemente, mediante el pipeline MiSeq SOP (https://mothur.org/wiki/MiSeq_SOP), se ejecutó Mothur, donde se estableció una carpeta de trabajo y posteriormente se combinó el conjunto de lecturas mediante el comando `make.contigs` para extraer las secuencias y los datos de puntuación de calidad del Fastq. Con este comando se creó el complemento inverso de las lecturas para después unir las en contigs y posteriormente eliminar las bases con una calidad phred inferior a Q25. Posteriormente, se eliminaron secuencias con bases ambiguas y con una longitud superior a 275 pb. Además, con el comando `unique.seqs` se eliminaron duplicados de secuencias, se agruparon con el comando `pre.cluster` y se alinearon con la base de datos SILVA v138 del Grupo de Bioinformática y Genómica Microbiana del Instituto Max Planck de Microbiología Marina, Alemania (Yilmaz et al., 2014). Se realizó una filtración de secuencias quiméricas utilizando el algoritmo VSEARCH que se encuentra en Mothur usando el comando `chimera.vsearch`. Se usó el comando `classify.seqs` para poder clasificarlas y posteriormente se empleó el comando `remove.lineage` con la finalidad de eliminar las secuencias de origen no bacteriano. Con los comandos `dist.seqs` y `cluster` se agruparon los OTUs y con el comando `phylotype` se clasificaron en phylum, clase, orden, familia y género. Se utilizó la base de datos EzBioCloud (Yoon et al., 2017) y la plataforma Microbiomeanalyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>) para determinar las secuencias no clasificadas a nivel de género. Se estimaron los valores de abundancia relativa y se realizaron los gráficos a nivel de phyla y familia utilizando Microsoft Excel 365 (Microsoft Corp., Redmond, WA, EE. UU).

La diversidad alfa fue estimada con el comando `summary.single` para obtener los índices de diversidad de Shannon y de riqueza de Chao por cada replica. Se utilizó el análisis discriminante lineal por efecto de tamaño (*LEfSe*) (*Microbiomeanalyst*) para identificar los géneros que ejercen una mayor diferencia entre grupos. Por otra parte, para evaluar la diversidad beta se estudió la estructura de las comunidades bacterianas utilizando un enfoque basado en OTUs mediante el análisis de coordenadas principales (PCoA) calculados con la medida de disimilitud de Bray-Curtis. Además, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) a nivel de género para reducir la dimensión de las variables originales entre los grupos CT y VK.

6.7. Análisis estadístico

Los datos se verificaron en cuanto a normalidad (prueba de Shapiro–Wilk) y homocedasticidad de varianza (prueba de Bartlett). Los datos de abundancia a nivel de phyla y familia se compararon mediante análisis de varianza unidireccional ANOVA o Kruskal Wallis dependiendo de su distribución y cuando se detectaron diferencias significativas se utilizó la prueba de comparación de rangos. Los datos de abundancia a nivel de género de los grupos CT y VK fueron analizados con una prueba T-test de dos colas. El análisis y los gráficos de PCA se realizaron utilizando GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc.). Con respecto al análisis de la composición y la estructura de la comunidad bacteriana, se aplicaron pruebas de análisis de varianza molecular (AMOVA), implementadas en el paquete de software MOTHUR (Schloss et al., 2009; Yoon et al., 2017) para determinar si el agrupamiento dentro de las ordenaciones es estadísticamente significativo.

7. RESULTADOS

7.1 Composición de la comunidad bacteriana

Se obtuvieron un total de 1,394,036 lecturas sin procesar tanto para las direcciones de *forward* como de *reverse*. Después del recorte de calidad y el filtrado, el tamaño de la biblioteca de cada muestra se normalizó al número más pequeño de secuencias obtenidas de las muestras de tracto digestivo de *S.senegalensis*. Se utilizaron un total de 278,367 secuencias con una profundidad de lectura media de $18,407 \pm 9,176$ (Tabla 3) y un total de 35,705 unidades taxonómicas operativas (OTUs, por sus siglas en inglés) con un 97% de similitud genética para los análisis posteriores.

Tabla 3. Procesamiento de las secuencias obtenidas por muestra.

Muestra*	Secuencias crudas	Secuencias procesadas	%
T0-1	113,594	23,410	20.6
T0-2	95,040	18,880	19.9
T0-3	103,108	22,030	21.4
T0-4	93,905	21,211	22.6
CT-1	190,551	36,207	19.0
CT-2	255,262	51,304	20.1
CT-3	87,488	17,177	19.6
CT-4	78,162	13,946	17.8
VK-1	100,878	20,715	20.5
VK-2	96,232	18,334	19.1
VK-3	69,636	14,486	20.8
VK-4	110,180	20,667	18.8

* Los números 1-4 representan las réplicas por cada grupo de estudio (T0, CT y VK).

Los índices de diversidad alfa fueron superiores con diferencias significativas para el tratamiento control (CT) en las estimaciones de OTUs observados ($p=0.0373$), riqueza de Chao ($p=0.0041$) y los índices de Shannon ($p=0.0046$). Por otra parte, los valores de OTUs observados mostraron una relación donde a mayor número de OTUs presentes en el tratamiento, mayor es el índice de diversidad de Shannon y el índice de riqueza de Chao (Fig. 5).

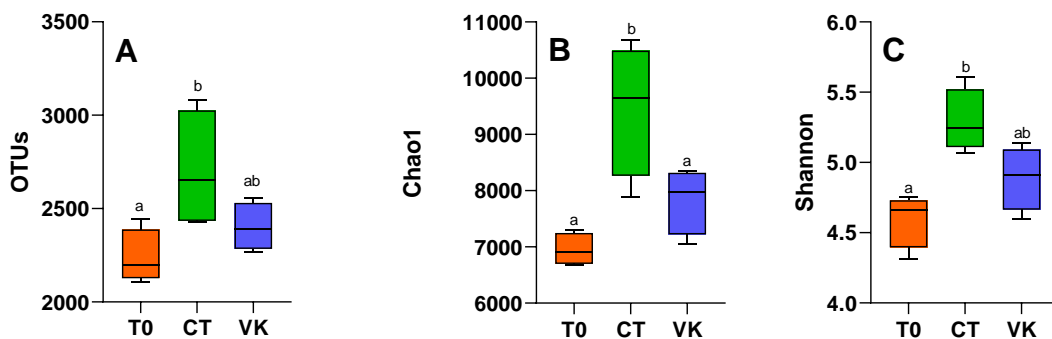


Figura 5. Medidas de diversidad alfa para las muestras. A) OTUs observados. B) Índice de riqueza de Chao. C) Diversidad de Shannon. Letras diferentes sobre los histogramas en caja indican diferencias significativas entre grupos experimentales (ANOVA; $p < 0.05$, $n=4$).

La caracterización taxonómica general de la comunidad bacteriana se realizó a nivel de (phyla, clase, familia y género) de aquellos grupos donde su abundancia presentara al menos un 0,02% de la composición total. Se encontró que el phylum *Proteobacteria* es el grupo dominante y que específicamente, junto a la clase *Gammaproteobacteria* forman al menos un 70% de la composición total. Mientras que las clases *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* denotaron una composición importante en todas las muestras, la presencia del phylum de *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria* y *Firmicutes* se encontraron en una menor proporción (Fig.6).

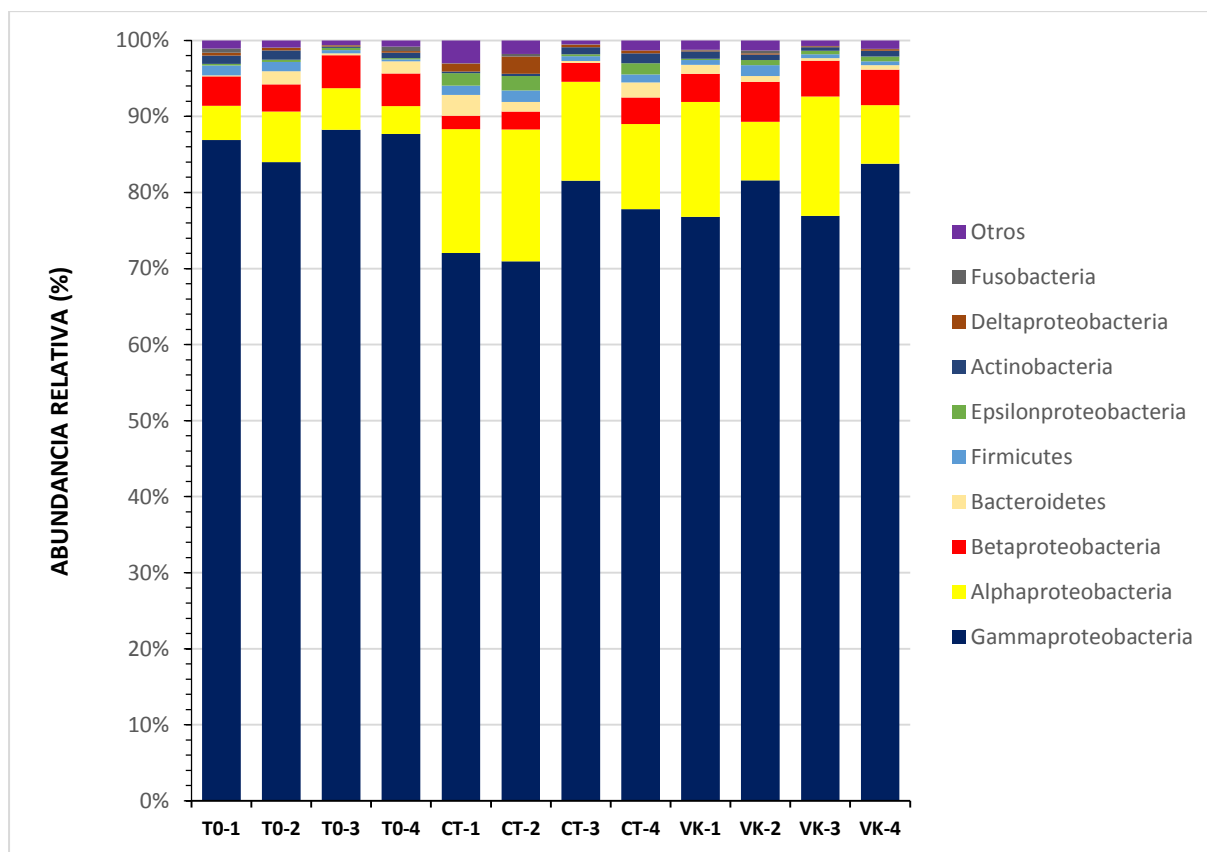


Figura 6. Abundancia relativa de microorganismos en el tracto digestivo de *Solea senegalensis* (Phylum *Proteobacteria* dividido a nivel taxonómico de clase).

Por otra parte, se encontraron un total de 22 familias con porcentajes de abundancia relativa > 0.02%. Las familias más representativas dentro de los tratamientos fueron *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*, ambas pertenecientes al phylum *Gammaproteobacteria* (Fig.7). En general, se encontró un distribución similar de los grupos dominantes entre tratamientos.

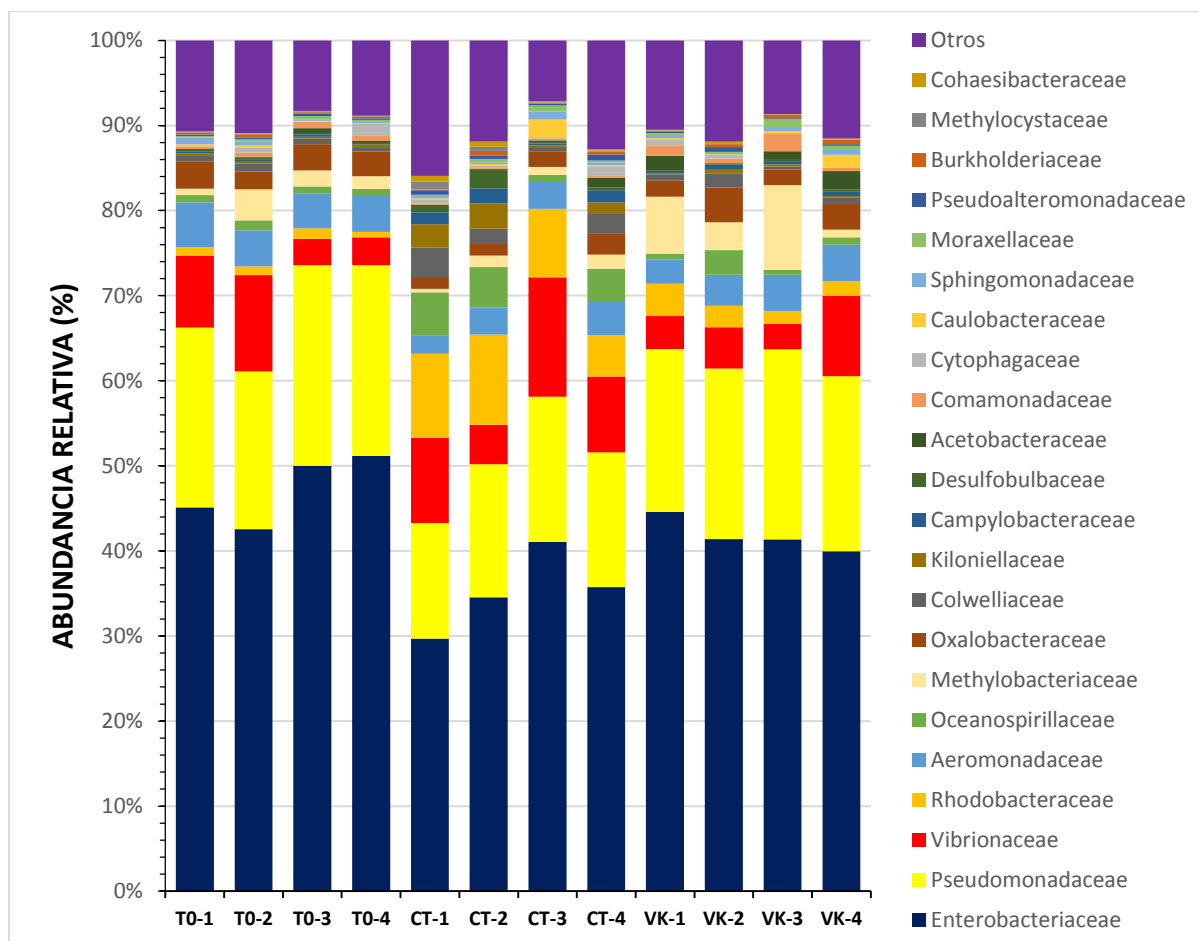


Figura 7. Abundancia relativa de grupos bacterianos a nivel de familia en el tracto digestivo de *Solea senegalensis*.

El grupo a tiempo cero (T0) estuvo constituido por una mayor abundancia relativa de *Enterobacteriaceae* ($p=0.6298$), mientras que *Oceanospirillaceae* mostró una mayor abundancia en CT ($p=0.2211$), al igual que *Methylobacteriaceae* en el grupo suplementado con filoquinona (VK) ($p=0.2528$). También, se encontraron familias que denotaron una mayor presencia en CT con diferencias significativas: *Rhodobacteriaceae* ($p=0.022$), *Comamonadaceae* ($p=0.0291$) y *Nocardiodaceae* ($p=0.0356$) (Fig.8).

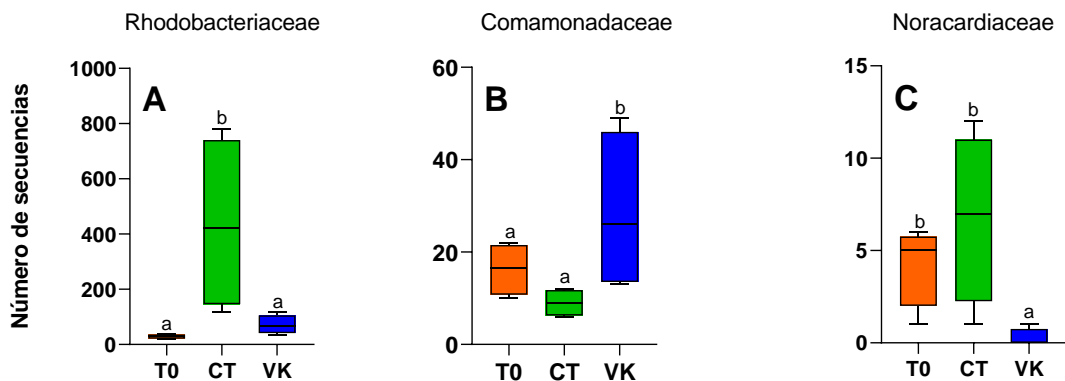


Figura 8. Abundancia diferencial a nivel de familia en el tracto digestivo de *Solea senegalensis*. (A) *Rhodobacteriaceae* (B) *Comamonadaceae* (C) *Nocardiodaceae*. Letras diferentes sobre los histogramas en caja indican diferencias significativas entre grupos experimentales (ANOVA; $p \leq 0.05$, $n=4$).

Se seleccionaron los 26 géneros con mayor abundancia relativa (Fig.9) y se realizó un análisis estadístico entre CT y VK mediante la prueba de t de Student de dos colas. Aunque no mostraron diferencias significativas *Neptunomonas* ($p=0.0537$), *Thalassolituus* ($p=0.0553$), *Arcobacter* ($p=0.0615$), *Ruegeira* ($p=0.0641$), *Kilionella* ($p=0.0578$) y *Escherichia_Shigella* ($p=0.0630$) tuvieron tendencias a ser superiores en CT, al igual que *Methylobacterium* ($p=0.0642$) que denotó dominancia en el tratamiento VK. Por otra parte, *Vibrio* ($p=0.0219$), *Colwellia* ($p=0.0475$) y *Pseudoalteromonas* ($p=0.0466$) mostraron diferencias significativas entre ambos tratamientos.

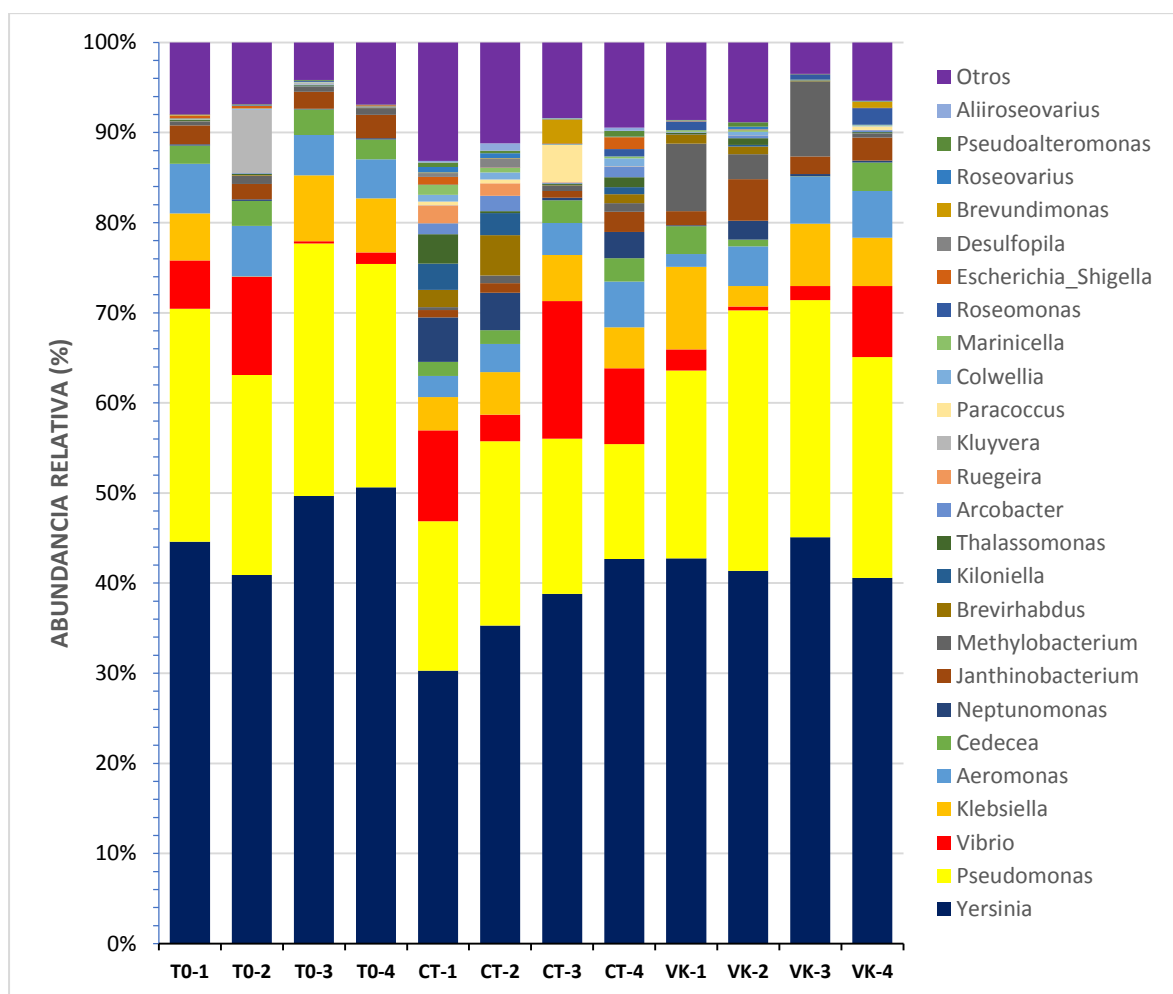


Figura 9. Abundancia relativa de grupos bacterianos a nivel de género en el tracto digestivo de *Solea senegalensis*.

Por otra parte, se realizó un análisis discriminante lineal por efecto del tamaño (*LEfSe*) para determinar los géneros que explican una mayor probabilidad de generar diferencias entre los tres grupos mediante el acoplamiento de pruebas estándar de significancia estadística no paramétrica. Las puntuaciones *LEfSe* pueden interpretarse como el grado de diferencia constante en la abundancia relativa entre características de los grupos de estudio. En este sentido, *Neptunomonas*, y miembros de la familia *Rhodobacteriaceae*: *Brevirhabdus* y *Ruegeira* son los que mejor permiten diferenciar las comunidades bacterianas entre los lenguados alimentados con dieta CT y las otras comunidades bacterianas presentes en los lenguados de T0 y VK (Fig. 10).

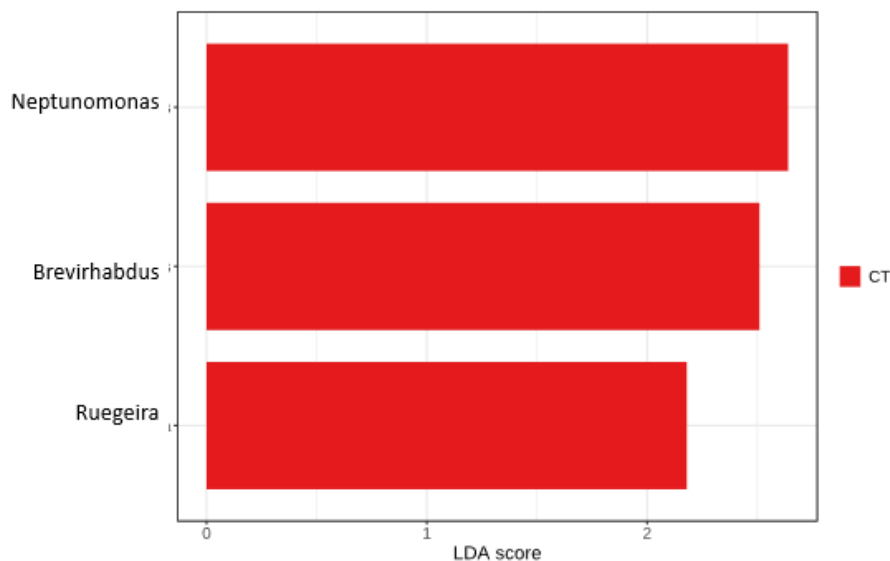


Figura 10. Análisis discriminante lineal por efecto del tamaño (*LEfse*) de las comunidades de microbiota intestinal del lenguado senegalés. El histograma representa los géneros de CT con puntuaciones superiores a 2 (Kruskal Wallis; $p < 0.05$, $n=4$).

7.2 Estructura de la comunidad bacteriana

Los efectos del tratamiento con vitamina K (VK) sobre la estructura de la comunidad bacteriana del lenguado senegalés se determinaron con una matriz de distancia utilizando la medida de Bray-Curtis y se visualizaron utilizando gráficos de PCoA (Fig.11). Aunque los resultados revelaron una separación entre T0, CT y VK, el tratamiento suplementado con filloquinona no obtuvo diferencias significativas con T0 y CT ($p > 0.05$). Por el contrario, solo se obtuvieron diferencias significativas en la estructura de la comunidad del T0 y CT al final del período experimental ($p < 0.05$). Estas observaciones se validaron mediante pruebas de AMOVA, según lo implementado por MOTHUR.

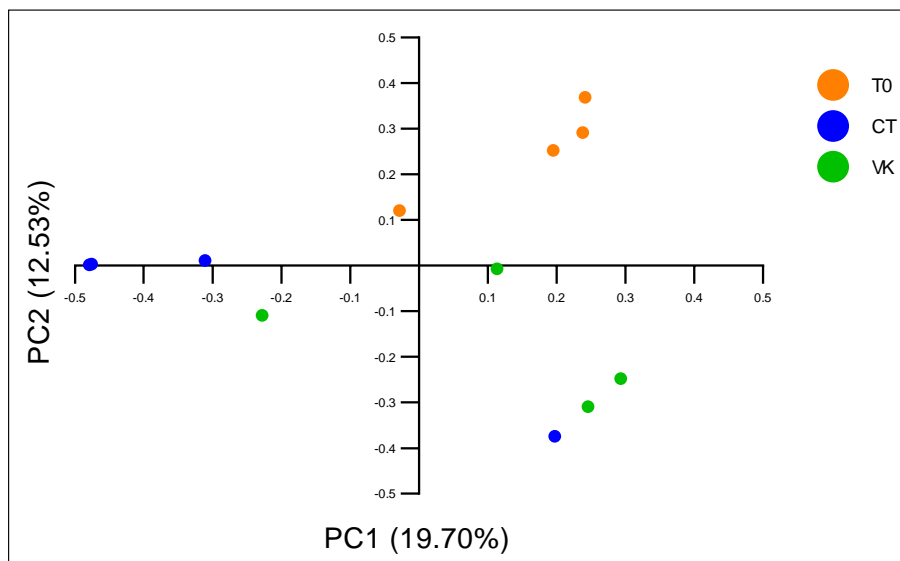


Figura 11. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la medida de disimilitud de Bray-Curtis. El gráfico representa la distribución de las comunidades bacterianas del intestino de lenguado senegalés con los tres grupos T0, CT y VK. El primer y segundo eje representan el 19.70% y 12.53% de la variación, respectivamente.

Tras visualizar una tendencia a la separación entre CT y VK en el gráfico de PCoA, se procedió a realizar un análisis de componentes principales (PCA) para determinar que géneros son los que ejercen una mayor variación entre estos grupos.

Con esta aproximación exploratoria se observó una separación más clara entre los grupos CT y VK, donde los dos primeros componentes explicaron el 67.7% de la variación total. Además, se mostró un claro agrupamiento y menor variación de las muestras VK (cuarto cuadrante), en comparación con las muestras CT que tuvieron una distribución más amplia (Fig. 11).

El componente 1 (PC1) explica el mayor porcentaje de diferencia donde se muestra un claro desplazamiento de géneros hacia la izquierda en el primer y tercer cuadrante. *Vibrio*, *Escherichia_Shigella*, *Thalassomonas*, *Colwellia*, *Roseovarius*, *Cohasibacter*, *Neptunomonas* y *Arcobacter* son algunas de las bacterias que están más relacionadas con las muestras CT. Por otro lado, *Delftia*, *Shewanella*, *Roseomonas* y *Methylobacterium* se ubicaron en el cuarto cuadrante, lo que indica una asociación entre las muestras de VK (Fig.12).

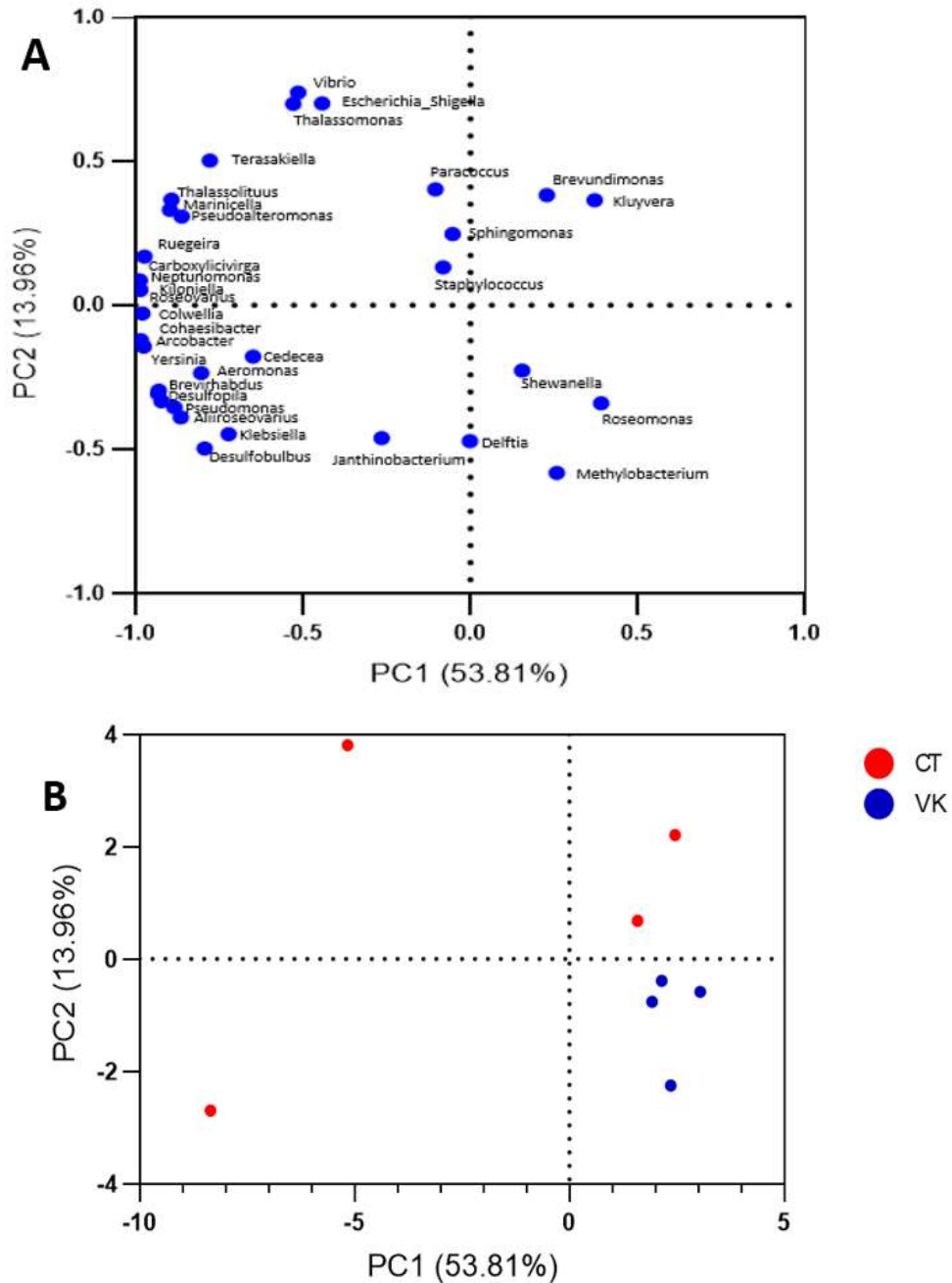


Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA) a nivel de género. (A) Gráfico de cargas, representa la distribución de los géneros presentes en los grupos (CT y VK). (B) Gráfico de puntuaciones, representa la dispersión de las muestras de cada grupo (CT y VK). En ambos gráficos, el primer y segundo eje representan el 53.81% y 13.96% de la variación, respectivamente.

8. DISCUSIÓN

El contenido óptimo de nutrientes es uno de los principales factores que influyen en el bienestar y la calidad de peces de cultivo dentro de cada etapa de producción. La VK es un micronutriente que ha ganado relevancia en el lenguado senegalés por sus implicaciones en el metabolismo óseo y procesos reproductivos. Entender la influencia de esta molécula en las comunidades microbianas del hospedero es esencial para ampliar la perspectiva de las funciones, y los mecanismos subyacentes que ejerce en el organismo. En el presente trabajo se caracterizó la estructura taxonómica de la microbiota del lenguado senegalés por efecto de una alimentación suplementada con vitamina K1.

8.1 Caracterización de las principales bacterias a nivel de phylum y familia

A nivel de phylum, *Proteobacteria* fue el más abundante. Específicamente, la clase *GammaProteobacteria* constituyó el porcentaje más alto de *Proteobacteria* encontrado. Estos resultados son similares a los obtenidos por Tapia-Paniagua et al. (2019) quienes encontraron a este phylum como dominante en la sección anterior y posterior del tracto digestivo de juveniles de lenguado senegalés, mientras que Domínguez-Maqueda et al. (2021) reportan la dominancia de éste en la sección anterior y una menor abundancia en la parte posterior del intestino. Además, previamente se ha descrito que *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* suelen representar hasta un 90% de la microbiota intestinal de los peces en diferentes especies marinas (Rimoldi et al., 2018), lo que sugiere que estos taxones están involucrados en importantes funciones intestinales del huésped, como la digestión, la absorción de nutrientes y/o la respuesta inmune. En general, no se observó una alta variabilidad en los valores de abundancia relativa en la microbiota de los peces alimentados con dieta suplementada en VK en comparación con una dieta control (CT). Sin embargo, fue posible observar una tendencia a la mayor abundancia en *Alphaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* en CT, mientras que la abundancia relativa *Fusobacteria* fue ligeramente superior en T0 en comparación con VK y CT (Fig. 6) ($p > 0.05$). Particularmente, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* son conocidos por participar activamente en la degradación de materia orgánica de alto peso molecular, al poseer un conjunto de genes que codifican para enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas o amilasas, mientras que *Fusobacteria* es un grupo de microorganismos

oportunistas que se asocia a menudo con especies carnívoras debido a su capacidad para metabolizar aminoácidos derivados de proteína animal (Id et al., 2020; Potrykus et al., 2008).

Como parte del perfil de abundancia relativa se visualizaron familias que presentan más del 60% de abundancia entre grupos: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae* y *Vibrionaceae*, siendo estas pertenecientes a la clase *Gamma-proteobacteria*. Aunque no es tan común encontrar *Enterobacteriaceae* como una familia dominante en el tracto digestivo de peces marinos, previamente se ha reportado una alta abundancia en peces sanos de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Parshukov et al., 2019). Se conoce que los géneros *Yersinia*, *Klebsiella*, *Shigella* y *Escherichia* se pueden encontrar como simbiontes transmitidos de manera horizontal por el agua o alimentos en otros peces cultivados como *Sparus aurata*, *Mullus barbatus*, *Atherina boyeri*, *Sardina pilchardu* y *Lithognathus mormyrus* (Elsherief et al., 2014; Matyar, 2016).

Por otra parte, la familia *Pseudomonaceae* es uno de los taxones predominantes en el lenguado senegalés en todos los tratamientos (Fig. 7). Resultados similares obtuvo Tapia-Paniagua (2015), quien registró una composición importante de bacterias del género *Pseudomonas* en la microbiota intestinal de larvas de *S. senegalensis*, aunque curiosamente pueden ausentarse en juveniles, lo que puede significar una mayor afinidad de estas bacterias en etapa larvaria. Simultáneamente, estudios previos han reportado que este grupo de bacterias puede encontrarse en mayor proporción cuando las condiciones de cultivo son llevadas a cabo a temperaturas elevadas y la dieta contiene krill y harina de camarón (Tapia-Paniagua et al., 2019). Aunque estas condiciones favorezcan la abundancia de *Pseudomonas*, se ha encontrado que las bacterias presentes en el tracto gastrointestinal también están presentes en los huevos, lo que puede sugerir una transmisión vertical a partir de los progenitores (Llewellyn et al., 2014).

8.2 Diversidad alfa y beta

Al evaluar la diversidad alfa se encontró que la riqueza de Chao fue superior en CT. Esto difiere con lo descrito por Disease et al. (2019), quienes señalan un aumento de la riqueza de Chao y

una correlación negativa con osteocalcina no carboxilada en humanos con una dieta suplementada con filoquinona. Sin embargo, el estudio se realizó en heces y no en el lumen intestinal como en el presente estudio. Por otra parte, la diversidad de Shannon en CT fue superior a T0, y aunque no mostró diferencias significativas con VK, mantuvo una clara tendencia a ser superior. En este sentido, Ellis et al. (2021) no encontraron diferencias significativas en la diversidad de Shannon de la microbiota cecal de ratones machos al comparar la inclusión de VK1, MK-4 y MK9 y una dieta deficiente de VK. Un aspecto a considerar en esta comparativa es que en la dieta control del lenguado (CT) no hay deficiencia de VK, como si lo hay en el estudio de Ellis et al. (2021). Sin embargo, también señalan que ratones hembra tuvieron una mayor diversidad de Shannon que ratones machos, aunque no encontraron diferencias estadísticas independientemente de la dieta administrada.

En este sentido, Ma et al. (2018) han reportado efectos dependientes del sexo en la diversidad en la microbiota intestinal del pez cebra. Esto puede sugerir que la VK, al igual que otros componentes dietéticos responda de manera distinta en peces hembras y machos, como se ha demostrado en reproductores de lenguado senegalés cuando son alimentados con estas mismas dietas durante la época reproductiva. La respuesta de por efecto del sexo no fue igual en cuanto al nivel de testosterona en plasma cuando alimentados con suplemento de VK (Fernández et al., 2019). Sin embargo, debido al tamaño de los peces en el presente estudio, no se pudo identificar claramente el sexo de los mismos.

En términos generales, los resultados de la diversidad beta indican que las muestras de VK mostraron una tendencia a agruparse, pero no se encontraron diferencias significativas en comparación de los grupos T0 y CT en el análisis de AMOVA a nivel de OTUs ($p > 0.05$) (Fig. 11). Curiosamente se mostraron diferencias significativas entre T0 y CT, lo que puede sugerir como un comportamiento dinámico de la microbiota. Aunque previamente se ha demostrado que en otros peces la microbiota intestinal es más maleable durante la primera alimentación y el inicio del desarrollo del pez (Huang et al., 2014; Keating et al., 2021), la microbiota intestinal de los animales acuáticos también es fluida y sensible a los cambios en la dieta durante la etapa juvenil y adulta (Ringø et al., 2016; Roquigny et al., 2021).

8.3 Efecto regulatorio de la filoquinona en la microbiota intestinal del lenguado

El hecho de que se haya mostrado una diferencia más clara entre los grupos T0 y CT en la diversidad alfa y beta sugiere que la filoquinona podría tener un efecto regulatorio en la proliferación de las comunidades bacterianas. Esta regulación podría sustentarse en una menor abundancia diferencial de potenciales patógenos en VK, mientras que la mayor diversidad alfa en CT podría estar asociada a un desequilibrio de la microbiota intestinal del lenguado por dichos grupos bacterianos.

Si bien es conocido que una menor diversidad microbiana puede estar asociada a enfermedades en la acuicultura, Petersen y Round (2014) denominan disbiosis al desequilibrio o cambio en la microbiota presente de forma natural en comparación con la de un individuo sano. Tanto la pérdida de microbios beneficiosos, la expansión de patobiontes y la pérdida de diversidad son eventos que pueden abarcar este término. En este sentido, el aumento de los índices de diversidad alfa en CT en comparación con VK podría considerarse bajo la extensión de este concepto al existir un aumento de microorganismos potenciales a producir una enfermedad. Principalmente *Vibrio*, *Arcobacter*, *Pseudoalteromonas* y algunas bacterias de la familia *Rhodobacteraceae* podrían explicar algunos de los cambios que suceden en el esquema de alimentación, donde también se ha establecido que el crecimiento excesivo de potenciales patógenos puede ser debido a la deficiencia del sistema de defensa inmune o al daño a la barrera de la mucosa intestinal (Li et al., 2017).

Se encontró una disminución de *Vibrio* en el tratamiento VK en comparación con el grupo CT a los 30 días de bioensayo ($p= 0.043$). Las infecciones ocasionadas por este patógeno en *S. senegalensis* han sido previamente registradas como una de las principales enfermedades microbiológicas de su cultivo (Arijo et al., 2005; Zorrilla et al., 2013). Además, se ha confirmado la presencia de las especies *Vibrio ichthyocentri*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio scopthalmi*, *Vibrio splendidus* (Batista et al., 2016; Martin-antonio et al., 2007; Tapia-Paniagua et al., 2010) en la microbiota del lenguado, por lo que se puede atribuir que los miembros de esta familia se pueden encontrar de manera recurrente en su microbiota y eventualmente

provocar daños a la salud dependiendo de la susceptibilidad del hospedero y las relaciones entre microorganismos (Zhu et al., 2002; Stecher et al., 2013).

Rubio et al. (2019) mencionan que la proliferación de *Vibrio* está controlada por el sistema inmunológico del huésped, lo que previene las infecciones sistémicas, mientras que la infección de cepas virulentas se basa en aspectos moleculares específicos de *Vibrio* para comprometer la función de las células inmunitarias del hospedador. Además de su mayor presencia en CT, el gráfico de PCA explica un desplazamiento más cercano a la distribución de las muestras CT y contraria a las muestras de VK (Fig.12). Estos resultados sugieren que los lenguados alimentados con dieta suplementada con vitamina K podrían tener un mejor estado de bienestar al tener una menor proporción de *Vibrio* en su intestino, además de considerar que las variaciones de abundancia de bacterias del género *Vibrio* en el lenguado senegalés son notablemente susceptibles a las variaciones de temperatura, pH, al tipo de cultivo y al tipo de alimentación (Pinto et al., 2019).

El posible efecto de una respuesta regulatoria de VK podría complementarse debido a su menor abundancia de *Arcobacter* presente en las muestras en comparación con CT ($p= 0.0614$) y debido a su distribución en el gráfico de PCA (Fig.12). Ou et al., (2019) evaluaron los efectos antioxidantes e inflamatorios de la astaxantina sobre la salud intestinal del pez globo japonés *Takifugu rubripes* donde encontraron una disminución de la abundancia relativa de *Arcobacter* al suministrar astaxantina en la dieta a 50 o 100 mg/kg. Además, este género es perteneciente a la clase *Epsilon-proteobacteria* y es conocido por ser patógeno oportunista y suele ser encontrado en organismos expuestos a ambientes con fracciones más altas de bacterias oportunistas (Vestrum et al., 2020). Existen registros de que *Arcobacter* podría tener significancia directa en el bienestar de organismos acuáticos al encontrarse un aumento de abundancia cuando los hospedadores presentan condiciones de enfermedad y/o estrés (Infante-Villamil et al., 2020). Además, el enriquecimiento de *Arcobacter* en *Seriola lalandi* se ha asociado con una reducción del tamaño corporal y del grosor de la piel (Legrand et al., 2018), mientras que en *Penaeus monodon* se presentó de manera diferencial en tanques con baja

productividad donde los animales mostraron signos de enfermedad (Infante-villamil et al., 2019).

Los estudios sobre los efectos de esta vitamina en el sistema inmunológico son limitados. Se ha establecido que uno de los componentes principales del sistema inmunológico innato es el sistema del complemento, que contiene más de 30 proteínas. Blom et al. (2004) sugieren que la VK modifica a la proteína S que está relacionada con la proteína de unión C4BP que forma parte del sistema del complemento y que actúa como factor de supervivencia para las células B a través de la interacción con el receptor CD40. Al igual que otras proteínas relacionadas con la cascada de complemento del sistema inmune, se encontró que el gen que codifica a la proteína C4B tiene una sobreexpresión en *Oncorhynchus mykiss* infectada con *Vibrio anguillarum* (Hou et al., 2021). Aunque son necesarios más estudios, la VK podría intervenir en la regulación de grupos microbianos, pues la relación bidireccional entre la microbiota y el huésped influyen en la regulación inmunológica innata y adaptativa, así como en la selección de conjuntos bacterianos del tejido mucoso (Legrand et al., 2020).

Rhodobacteraceae fue significativamente más abundante en CT (Fig.8A). Específicamente, *Brevirhabdus* y *Ruegeira* son dos de los géneros que explican la mayor magnitud de diferencia en la abundancia en comparación con los otros grupos. Los miembros de esta familia se encuentran comúnmente en el ambiente marino y son conocidos por ser en su mayoría no cultivables (Rurangwa et al., 2015). Se ha descrito que pueden participar en la degradación de moléculas orgánicas e inorgánicas, oxidación de azufre, fotosíntesis anoxigenica, oxidación de monóxido de carbono y en la síntesis de metabolitos secundarios (Pujalte et al., 2014). Existen reportes previos de Rhodobacteraceae en el intestino de *S. senegalensis* y rodaballo (*Scophthalmus maximus*) bajo sistemas de recirculación, así como en el cultivo de pez plano japonés (*Paralichthys olivaceus*) (Kim & Kim, 2013). También, se ha encontrado una mayor abundancia relativa de esta familia en la microbiota intestinal de *Seriola lalandi* a una temperatura ambiente de 20 °C y una dieta baja en lípidos (7%) al comparar con dietas con una mayor composición lipídica (14% y 21%) (Larios et al., 2021). A pesar de su asociación con ciertos procesos metabólicos, su función en hospederos puede ser relacionada de forma

variable. En camarón blanco (*P. vannamei*), su sobreabundancia ha sido asociada como uno de los grupos predictores de un bajo estatus de salud y con un bajo peso corporal (Xiong et al., 2017; Fan et al., 2019), mientras que también parece tener potencial probiótico al reducir la influencia del estrés ocasionado por bajas temperaturas (Liu et al., 2019).

Pseudoalteromonas se mantuvo con una baja abundancia relativa en todas las muestras, sin embargo, en CT fue superior a VK con diferencias significativas ($p= 0.0466$). No se tienen registros de su presencia en *S. senegalensis*, pero este género es conocido por encontrarse en huéspedes del medio marino como la dorada (*Sparus aurata*) y lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) (Pujalte et al., 2007). Aunque parece reducir la competencia microbiana al producir compuestos antimicrobianos y formación de biopelículas (Richards et al., 2017), se ha detectado que algunas cepas podrían sintetizar proteasas con potencial de generar virulencia en esponjas marinas (Choudhury et al., 2015). Si bien *Pseudoalteromonas* no es un patógeno obligado, ha sido considerada una bacteria oportunista que se ha usado como un indicador temprano de las condiciones en criaderos de moluscos, que al incrementar su abundancia puede ocasionar altas mortalidades (Sandaa et al., 2008).

Por otra parte, no es posible evidenciar un efecto regulatorio específico sobre la abundancia de bacterias productoras de menaquinonas en la microbiota del lenguado. Aunque los grupos de bacterias que presentaron diferencias significativas, no son comúnmente asociadas con la producción de menaquinonas como lo son *Ruminococaceae*, *Bacillus* y *Lactobacillus* (Ellis et al., 2021; Walther et al., 2017), la familia *Nocardiaceae* ($p=0.0356$) y *Escherichia-Shigella* ($p=0.0629$) mostraron una disminución en VK y son conocidas por tener la capacidad de sintetizar MK-8 (Fig. 8C) (Karl et al., 2015; Lee et al., 2020). Previamente Richard et al. (2014) encontraron que el contenido de MK-4 en las larvas de lenguado senegalés fue constante independientemente de los niveles de filoquinona suministrados, además de que no existe evidencia de que VK1 pueda ser convertida en VK2 vía bacteriana. No se puede evidenciar de manera clara que al sobrepasar los requerimientos de vitamina K no es necesario la obtención de la misma por parte del microbioma. Sin embargo, debido a que la producción de menaquinonas no es específica para dichos grupos de bacterias y al aumento de riqueza en el

tratamiento CT, no se descarta una mayor producción de VK2 por la menor presencia de vitamina K en la dieta de organismos juveniles.

De acuerdo al análisis de componentes principales, se detectaron los géneros que establecen una mayor diferencia entre VK y CT (Fig.12). *Methylobacterium*, *Roseomonas*, *Shewanella* y *Delftia* fueron los géneros que se mostraron más asociados con las muestras de VK, mientras que *Neptunomonas*, *Colwellia* y *Thalassomonas* tuvieron una relación cercana con CT, a parte de otros grupos bacterianos mencionados previamente. *Methylobacterium* es proveniente de la clase *Alphaproteobacteria* y se conoce que la mayoría de las especies son metilótrofas facultativas capaces de crecer en compuestos de un solo carbono como fuente de energía, además de que se sabe que este género produce poli-beta-hidroxibutirato, una molécula que puede participar en la inhibición del crecimiento de patógenos, lo que también podría justificar su menor presencia en VK (Defoirdt et al., 2007; Halet et al., 2007; Kelly et al., 2014). La relación de *Roseomonas* y *Delftia* (de la familia *Comamonadaceae*) con VK podría sugerir su participación en la degradación de compuestos carbonados (Fig. 8B) (Jiang et al., 2006). Ikeda-Ohtsubo et al., (2020) encontraron que *Comamonadaceae* fue una de las familias que modularon la composición de la microbiota intestinal del pez cebra al suplementar fucoïdan (polisacárido obtenido de algas marinas). Además, se ha encontrado que miembros de esta familia participan en la degradación de compuestos aromáticos como tolueno y benceno (Révész et al., 2020). De la misma forma, *Neptunomonas*, *Colwellia* y *Thalassolituus* son conocidas por tener posibles roles en la descomposición de compuestos alifáticos y aromáticos en ambientes marinos (Choi y Cho, 2013; Berry y Gutierrez, 2017; Levican et al., 2020), por lo que es posible que estas bacterias hayan establecido una relación comensal o simbiótica con el hospedero participando en la degradación de materia orgánica.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuyen a la comprensión del efecto de la vitamina K en peces teleósteos como *S. senegalensis*. La suplementación de filoquinona en la dieta del lenguado podría participar en el equilibrio en la microbiota intestinal al regular la proliferación de potenciales patógenos como *Vibrio*, *Arcobacter*, *Pseudoalteromonas* y miembros de la familia Rhodobacteraceae.

De acuerdo a la evidencia en mamíferos, se podría considerar que una ratio variable de machos/hembras entre tratamientos podría afectar los valores de diversidad y riqueza.

Neptunomonas, *Brevirhabdus* y *Ruegeira* son los géneros que mejor permiten diferenciar a CT de las comunidades bacterianas en T0 y VK.

Las bacterias productoras de menaquinonas (*Escherichia*, *Shigella* y la familia Nocariodaceae) tuvieron una disminución en la dieta suplementada con filoquinona, sin embargo otros grupos bacterianos potenciales productores de VK₂ no mostraron diferencias significativas.

Para futuros estudios se recomienda hacer uso de herramientas como Tax4Fun o PICRUSt para predecir los perfiles funcionales, o bien un enfoque metagenómico (*shotgun*) para ampliar el entendimiento de los procesos biológicos y las características asociadas a las comunidades bacterianas en el hospedero. Se recomienda considerar la distinción de la microbiota entre peces hembras y machos, así como el uso de marcadores moleculares para establecer el rol que la filoquinona puede tener en la modulación del sistema inmune de los peces.

10. LITERATURA CITADA

Alvial, A., Manríquez, J. 1999. Diversification of flatfish culture in Chile. *Aquaculture*, 176: 65- 73. doi:10.1016/S0044-8486(99)00051-4

Anguis, V., & Cañavate, J. P. (2005). Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture*, 243(1–4), 133–145. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.026>

APROMAR. (2020). Informe de Acuicultura España 2020. 95. <http://www.apromar.es/content/informes-anales> [consulta 7 septiembre 2021]

Arijo, S., Rico, R., Chabrillon, M., Diaz-Rosales, P., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Magariños, B., Toranzo, A.E. and Moriñigo, M.A. (2005). Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, 28: 33-38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00597.x>

Batista, S., Medina, A., Pires, M. A., Moriñigo, M. A., Sansuwan, K., Fernandes, J. M. O., Valente, L. M. P., & Ozório, R. O. A. (2016). Innate immune response, intestinal morphology and microbiota changes in Senegalese sole fed plant protein diets with probiotics or autolysed yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(16), 7223–7238. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7592-7>

Batista, S., Ozório, R. O. A., Kollias, S., Dhanasiri, A. K., Lokesh, J., Kiron, V., Valente, L. M. P., & Fernandes, J. M. O. (2016). Changes in intestinal microbiota, immune- and stress-related transcript levels in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) fed plant ingredient diets intercropped with probiotics or immunostimulants. *Aquaculture*, 458, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.002>

Beato, S., Toledo-Solís, F. J., & Fernández, I. (2020a). Vitamin K in Vertebrates' Reproduction: Further Puzzling Pieces of Evidence from Teleost Fish Species. *Biomolecules* 10(9), 1303. <https://doi.org/10.3390/biom10091303>

Beato, S., Marques, C., Laizé, V., Gavaia, P. J., & Fernández, I. (2020b). New insights on vitamin K metabolism in senegalese sole (*Solea senegalensis*) based on ontogenetic and tissue-specific vitamin K epoxide reductase molecular data. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10). <https://doi.org/10.3390/ijms21103489>

Berry, D., & Gutierrez, T. (2017). Evaluating the detection of hydrocarbon-degrading bacteria in 16S rRNA gene sequencing surveys. *Frontiers in Microbiology*, 8(5), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00896>

Bjørndal, T., Guillen, J., & Imsland, A. (2016). The potential of aquaculture sole production in Europe: Production costs and markets. *Aquaculture Economics and Management*, 20(1), 109–129. <https://doi.org/10.1080/13657305.2016.1124939>

Blom, A. M., Villoutreix, B. O., & Dahlbäck, B. (2004). Complement inhibitor C4b-binding protein — friend or foe in the innate immune system ?. *Molecular immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.12.002>

Bolker, J.A., Hill, C.R., 2000. Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. *J. Fish Biol.* 56, 1029–1052.

Brown, R. T., Colburn, H. R., Nardi, G. C., Berlinsky, D. L. 2013. Cryopreservation of summer flounder, *Paralichthys dentatus* L., sperm. *Aquaculture Research*, 44: 1560–1567. doi: 10.1111/j.1365-2109.2012.03163.x.

Butt, R. L., & Volkoff, H. (2019). Gut Microbiota and Energy Homeostasis in Fish. *Frontiers in endocrinology*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00009>

Canada, P., Conceição, L. E. C., & Valente, L. M. P. (2019). Improving growth potential in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) through dietary protein. *Aquaculture*, 498(December 2017), 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.044>

Carballo, C., Pinto, P. I. S., Mateus, A. P., Berbel, C., Guerreiro, C. C., Martinez-Blanch, J. F., Codoñer, F. M., Mantecon, L., Power, D. M., & Manchado, M. (2019). Yeast β -glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 92, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.044>

Castro N., Toranzo A.E., Devesa S, González A, Nuñez S, Magariños B (2012). First description of *Edwardsiella tarda* in Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, 35, 79-82.

Choi, A., & Cho, J. C. (2013). *Thalassolituus marinus* sp. nov., a hydrocarbonutilizing marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART6), 2234–2238. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.046383-0>

Choudhury JD, Pramanik A, Webster NS, Llewellyn LE, Gachhui R, Mukherjee J. (2015). The Pathogen of the Great Barrier Reef Sponge *Rhopaloeides odorabile* Is a New Strain of *Pseudoalteromonas agarivorans* Containing Abundant and Diverse Virulence-Related Genes. *Mar Biotechnol* (NY). doi: 10.1007/s10126-015-9627-y

Conceição, L. E. C., Ribeiro, L., Engrola, S., Aragão, C., Morais, S., Lacuisse, M., Soares, F., & Dinis, M. T. (2007). Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 268(1-4 SPEC. ISS.), 64–81. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.030>

Dam H. (1935). The antihemorrhagic vitamin of the chick. *The Biochemical journal*, 29(6), 1273–1285. <https://doi.org/10.1042/bj0291273>

de Azevedo, A. (2017). Caracterización de las anomalías vertebrales en distintas fases de producción del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*): estudio estereoscópico, radiográfico e histológico. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

de Azevedo, A. M., Losada, A. P., Ferreiro, I., Riaza, A., Vázquez, S., & Quiroga, M. I. (2017). New insight on vertebral anomalies in cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) at early

stages of development. *Journal of Fish Diseases*, 40(8), 987–1000. <https://doi.org/10.1111/jfd.12575>

Defoirdt T, Halet D, Vervaeren H, Boon N, Van de Wiele T. (2007) The bacterial storage compound poly- β -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environ Microbiol* 9: 445-452. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01161.x

Deschamps, M. H., Kacem, A., Ventura, R., Courty, G., Haffray, P., Meunier, F. J., & Sire, J. Y. (2008). Assessment of “discreet” vertebral abnormalities, bone mineralization and bone compactness in farmed rainbow trout. *Aquaculture*, 279(1–4), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.036>

Disease, C., Wagatsuma, K., Yamada, S., Ao, M., Matsuura, M., & Tsuji, H. (2019). Diversity of Gut Microbiota Affecting Serum Level of Undercarboxylated Osteocalcin in Patients with. *Nutrients*, 11, 1541.

Domínguez-Maqueda, M., Cerezo, I. M., Tapia-Paniagua, S. T., De La Banda, I. G., Moreno-Ventas, X., Moriñigo, M. Á., & Balebona, M. C. (2021). A tentative study of the effects of heat-inactivation of the probiotic strain *Shewanella putrefaciens* ppd11 on senegalese sole (*Solea senegalensis*) intestinal microbiota and immune response. *Microorganisms*, 9(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040808>

Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology*, 9(5), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>

Ellis, J. L., Karl, J. P., Oliverio, A. M., Fu, X., Soares, J. W., Wolfe, B. E., Hernandez, C. J., Mason, J. B., & Booth, S. L. (2021). Dietary vitamin K is remodeled by gut microbiota and influences community composition. *Gut Microbes*, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1887721>

Elsherief, M., Mousa, M., ElGalil, H., & ElBahy, E. (2014). Enterobacteriaceae Associated with Farm Fish and Retailed ones. In *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 42 (1), 99. ScopeMed. <https://doi.org/10.5455/ajvs.153299>

Faílde L.D. (2013). Tenacibaculosis en lenguado y rodaballo: caracterización morfológica y de la respuesta inmunitaria. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

Fan, J., Chen, L., Mai, G., Zhang, H., Yang, J., & Deng, D. (2019). Dynamics of the gut microbiota in developmental stages of *Litopenaeus vannamei* reveal its association with body weight. *Scientific reports*, November 2018, 2–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37042-3>

Fernández, I., Fernandes, J. M. O., Roberto, V. P., Kopp, M., Oliveira, C., Riesco, M. F., Dias, J., Cox, C. J., Leonor Cancela, M., Cabrita, E., & Gavaia, P. (2019). Circulating small non-coding RNAs provide new insights into vitamin K nutrition and reproductive physiology in teleost fish. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1863(1), 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.09.017>

Fernández, I., Pimentel, M. S., Ortiz-Delgado, J. B., Hontoria, F., Sarasquete, C., Estévez, A., Zambonino-Infante, J. L., & Gisbert, E. (2009). Effect of dietary vitamin A on Senegalese sole

(*Solea senegalensis*) skeletogenesis and larval quality. *Aquaculture*, 295(3–4), 250–265. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.046>

FishBase. (2021). Disponible en: <https://www.fishbase.se/summary/Solea-senegalensis.html> [consulta: 7 septiembre 2021]

Gajardo, K., Jaramillo-Torres, A., Kortner, T. M., Merrifield, D. L., Tinsley, J., Bakke, A. M., & Krogdahl, Å. (2017). Alternative protein sources in the diet modulate microbiota and functionality in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Applied and Environmental Microbiology*, 83(5). <https://doi.org/10.1128/AEM.02615-16>

Gavaia, P. J., Dinis, M. T., & Cancela, M. L. (2002). Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 211, 305–323. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00167-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00167-9)

Gavaia PJ, Domingues S, Engrola S, Drake P, Sarasquete C, Dinis MT, Cancela ML (2009). Comparing skeletal development of wild and hatchery-reared Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858): evaluation in larval and postlarval stages. *Aquaculture Research*, 40, 1585-1593.

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>

Halder, M., Petsophonsakul, P., Akbulut, A. C., Pavlic, A., Bohan, F., Anderson, E., Maresz, K., Kramann, R., & Schurgers, L. (2019). Vitamin K: Double bonds beyond coagulation insights into differences between vitamin K1 and K2 in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms20040896>

Halet D, Defoirdt T, Van Damme P, Vervaeren H, Forrez I. (2007) Poly-β-hydroxybutyrate-accumulating bacteria protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *FEMS Microbiol Ecol* 60: 363-369. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00305.x

Hou, Z., Xin, Y., Yang, X., Zeng, C., & Zhao, H. (2021). Transcriptional Profiles of Genes Related to Stress and Immune Response in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Symptomatically or Asymptomatically Infected With *Vibrio anguillarum*. 12(April). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.639489>

Huang, Z., Li, X., Wang, L., & Shao, Z. (2014). Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/are.12628>

Id, L. P., Mazumder, D., Id, J. S., & Egan, S. (2020). Diet type influences the gut microbiome and nutrient assimilation of Genetically Improved Farmed Tilapia (*Oreochromis niloticus*). 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237775>

Ikeda-Ohtsubo, W., López Nadal, A., Zaccaria, E., Iha, M., Kitazawa, H., Kleerebezem, M., & Brugman, S. (2020). Intestinal Microbiota and Immune Modulation in Zebrafish by Fucoidan From Okinawa Mozuku (*Cladosiphon okamuranus*). *Frontiers in Nutrition*, 7(6), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00067>

- Infante-Villamil, S., Huerlimann, R. and Jerry, D. R. (2020). Microbiome diversity and dysbiosis in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 1–20. <https://doi.org/10.1111/raq.12513>
- Infante-villamil, S., Huerlimann, R., Condon, K., Maes, G. E., Jerry, D. R., Industrial, C., & Prawn, A. (2019). Bacterial signatures of productivity decay in *Penaeus monodon* ponds infected with PirA toxin. *Aquaculture*, 511, 734202. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734202>
- Fuentes J. (2014). Efecto del tipo de lípido en la actividad de las lipasas digestivas durante la etapa larvaria del lenguado de California (*Paralichthys californicus*). Tesis de maestría. Centro de Investigación científica y de educación superior de Ensenada, Baja California.
- Jiang, C., Dai, X., Wang, B., & Zhou, Y. (2006). *Roseomonas lacus* sp . nov ., isolated from freshwater lake sediment. 25–28. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63938-0>
- Karl, J. P., Fu, X., Wang, X., Zhao, Y., Shen, J., Zhang, C., Wolfe, B. E., Saltzman, E., Zhao, L., & Booth, S. L. (2015). Fecal menaquinone profiles of overweight adults are associated with gut microbiota composition during a gut microbiota – targeted dietary. *Am J Clin Nutr Doi*;, C, 1–10. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.109496>.
- Kelly, D. P., Mcdonald, I. R., & Wood, A. P. (2014). The Family Methylobacteriaceae. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1>
- Kim, D., & Kim, D. (2013). Microbial diversity in the intestine of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 414–415, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.06.008>
- Koumoundouros, G. (2010). Morpho-anatomical abnormalities in Mediterranean marine aquaculture. *Recent Advances in Aquaculture Research*, 661(2), 125–148.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq. 79(17), 5112–5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>
- Krossøy C. , Waagbø R., Ø. R. (2011). Vitamin K in fish nutrition. *Aquaculture Nutrition*, 17, 585–594. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00904.x>
- Ku, C.S.K., Roukos, D.H., 2013. From next-generation sequencing to nanoporesequencing technology: paving the way to personalized genomic medicine. *Expert Rev. Med. Devices* 10 (1), 1–
- Lambert, W.E. and De Leenher, A.P. 1992. Vitamin K. In: *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*, 2nd ed. p. 197- 233. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Larios, E., Re-, S. A. D., Gómez-, A. B., Tovar, D., Idaly, R., & Galaviz, E. M. A. (2021). Reciprocal effect of temperature and dietary lipids on metabolic performance and gut microbiota of Yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) juveniles. *Aquaculture research*, 1–16. <https://doi.org/10.1111/are.15480>
- Lee, S. D., Kim, I. S., Verbarq, S., & Joung, Y. (2020). *Antrihabitans stalactiti* gen . nov ., sp . nov ., a new member of the family Nocardiaceae isolated from a cave. 5503–5511. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004444>
- Legrand, T. P. R. A., Catalano, S. R., Wos-Oxley, M. L., Stephens, F., Landos, M., Bansemer, M. S., Stone, D. A. J., Qin, J. G., & Oxley, A. P. A. (2018). The inner workings of the outer surface: Skin

and gill microbiota as indicators of changing gut health in Yellowtail Kingfish. *Frontiers in Microbiology*, 8(1), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02664>

Legrand, T. P. R. A., Wynne, J. W., Weyrich, L. S., & Oxley, A. P. A. (2020). Investigating Both Mucosal Immunity and Microbiota in Response to Gut Enteritis in Yellowtail Kingfish. *Microorganisms*, 8(9), 1267. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091267>

Levican, A., Fisher, J. C., McLellan, S. L., & Avendaño-Herrera, R. (2020). Microbial communities associated with farmed *Genypterus chilensis*: Detection in water prior to bacterial outbreaks using culturing high-throughput sequencing. *Animals*, 10(6), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ani10061055>

Li, T., Li, H., Gatesoupe, F. J., She, R., Lin, Q., Yan, X., Li, J., & Li, X. (2017). Bacterial Signatures of “Red-Operculum” Disease in the Gut of Crucian Carp (*Carassius auratus*). *Microbial Ecology*, 74(3), 510–521. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0967-1>

Liu, J., Wang, K., Wang, Y., Chen, W., Jin, Z., & Yao, Z. (2019). Strain-specific changes in the gut microbiota profiles of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to cold stress. *Aquaculture*, 503(August 2018), 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.026>

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(6), 1–1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00207>

Lobo, C., Moreno-Ventas, X., Tapia-Paniagua, S., Rodríguez, C., Moriñigo, M. A., & de La Banda, I. G. (2014). Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in Senegalese sole larviculture. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(1), 295–309. <https://doi.org/10.1007/S10695-013-9844-0>

Lobo, C., Tapia-Paniagua, S., Moreno-Ventas, X., Alarcón, F. J., Rodríguez, C., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., & de La Banda, I. G. (2014). Benefits of probiotic administration on growth and performance along metamorphosis and weaning of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 433, 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.011>

Lucano-ramírez, G., Gómez-garcía, M. D. J., Ruiz-ramírez, S., Aguilar-betancourt, C., & Flores-ortega, J. R. (2019). Reproductive characteristics of the sole *Achirus mazatlanus* (Pleuronectiformes: Achiridae) in the Barra de Navidad coastal lagoon, Jalisco, Mexico. *Ciencias Marinas*, 45, 47–58. <https://doi.org/10.7773/cm.v45i2.2952>

Ma, Y., Song, L., Lei, Y., Jia, P., Lu, C., Wu, J., Xi, C., Strauss, P. R., & Pei, D. S. (2018). Sex dependent effects of silver nanoparticles on the zebrafish gut microbiota. *Environmental Science: Nano*, 5(3), 740–751. <https://doi.org/10.1039/c7en00740j>

Magariños B, Devesa S, González A, Castro N, Toranzo A (2011). Furunculosis in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) cultured in a recirculation system. *Veterinary Record*, 168, 431. DOI: 10.1136/vr.c6754

MAMR. (2011). Diversificación en acuicultura: Una herramienta para la sostenibilidad. España. ISBN: 978-84-491-1121-1

Manchado, M., Planas, J. V., Cousin, X., Rebordinos, L., & Claros, M. G. (2016). Current status in other finfish species. In *Genomics in Aquaculture* (195–221). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801418-9.00008-1>

MAPA. (2017). Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. El mercado del lenguado en España. Disponible en: <http://www.mapama.gob.es> [consulta: 7 septiembre 2021].

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. 1213–1222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01790.x>

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.X>

Martínez, D. (2011). Efectos de la administración del probiótico *Shewanella pdp 11* en juveniles de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) y desarrollo de un método para encapsulación. Tesis doctoral. Universidad de Almería.

Morais, S., Aragão, C., Cabrita, E., Conceição, L. E. C., Constenla, M., Costas, B., Dias, J., Duncan, N., Engrola, S., Estevez, A., Gisbert, E., Mañanós, E., Valente, L. M. P., Yúfera, M., & Dinis, M. T. (2016). New developments and biological insights into the farming of *Solea senegalensis* reinforcing its aquaculture potential. *Reviews in Aquaculture*, 8(3), 227–263. <https://doi.org/10.1111/raq.12091>

Noga E. (2010). *Fish disease: diagnosis and treatment*. Wiley-Blackwell, Ames, USA. ISBN: 9781118786758.

Noga E.J., Ullal A.J., Corrales J., Fernández J.M. (2011). Application of antimicrobial polypeptide host defenses to aquaculture: Exploitation of downregulation and upregulation responses. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part D: Genomics and Proteomics*, 6:44- 54.

Norambuena, F., Estevez, A., Bell, G., Carazo, I., & Duncan, N. (2012). Proximate and fatty acid compositions in muscle, liver and gonads of wild versus cultured broodstock of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 356–357, 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.018>

Ou, W., Liao, Z., Yu, G., Xu, H., Liang, M., Mai, K., & Zhang, Y. (2019). The effects of dietary astaxanthin on intestinal health of juvenile tiger puffer *Takifugu rubripes* in terms of antioxidative status, inflammatory response and microbiota. *Aquaculture Nutrition*, 25(2), 466–476. <https://doi.org/10.1111/anu.12872>

Parshukov, A. N., Kashinskaya, E. N., Andree, K. B., Solovyev, M. M., Simonov, E. P., Hlunov, O. V, & Izvekova, G. I. (2019). Variations of the intestinal gut microbiota of farmed rainbow trout , *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), depending on the infection status of the fish. November 2018. <https://doi.org/10.1111/jam.14302>

Petersen, C., & Round, J. L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular Microbiology*, 16(7), 1024–1033. <https://doi.org/10.1111/cmi.12308>

Pinto, P. I. S., Guerreiro, C. C., Costa, R. A., Martínez-Blanch, J. F., Carballo, C., Codoñer, F. M., Manchado, M., & Power, D. M. (2019). Understanding pseudo-albinism in sole (*Solea senegalensis*): a transcriptomics and metagenomics approach. *Scientific Reports*, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49501-6>

Pinto, W., & Conceição, L. (2018). Towards an early weaning in Senegalese sole : A historical review. *Aquaculture*, 496(April), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.077>

Potrykus, J., White, R. L., & Bearne, S. L. (2008). Proteomic investigation of amino acid catabolism in the indigenous gut anaerobe *Fusobacterium varium*. *Proteomics*, 2691–2703. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700437>

Pujalte M., Sitjà-Bobadilla A., Macián M., Álvarez-Pellitero P., Garay E. (2007). Occurrence and virulence of *Pseudoalteromonas* spp. in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Molecular and phenotypic characterisation of *P. undina* strain U58. *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.06.015>

Révész, F., Farkas, M., Kriszt, B., Szoboszlai, S., Benedek, T., & Táncsics, A. (2020). Effect of oxygen limitation on the enrichment of bacteria degrading either benzene or toluene and the identification of *Malikia spinosa* (*Comamonadaceae*) as prominent aerobic benzene-, toluene-, and ethylbenzene-degrading bacterium: enrichment, isolation and whole-genome analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(25), 31130–31142. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09277-z>

Ribeiro L., Engrola S., Dinis M. (2005). Weaning of Senegalense sole (*Solea senegalensis*) postlarve to an inert diet with a co-feeding regime. *Ciencias Marinas* 31, 327-337.

Ribeiro L., Zambonino-Infante J., Cahu C., Dinis M. (1999). Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*, 179, 1–4. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00180-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00180-5)

Richard, N., Fernández, I., Wulff, T., Hamre, K., Cancela, L., Conceição, L. E. C., & Gavaia, P. J. (2014). Dietary Supplementation with Vitamin K Affects Transcriptome and Proteome of Senegalese Sole, Improving Larval Performance and Quality. *Marine Biotechnology*, 16(5), 522–537. <https://doi.org/10.1007/s10126-014-9571-2>

Richards GP, Watson MA, Needleman DS, Uknalis J, Boyd EF, Fay JP. (2017). Mechanisms for *Pseudoalteromonas piscicida*- induced killing of vibrios and other bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol*, 83:e00175- 17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00175-17>

Rimoldi, S., Terova, G., Ascione, C., Giannico, R., & Brambilla, F. (2018). Next generation sequencing for gut microbiome characterization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed animal by-product meals as an alternative to fishmeal protein sources. *PLoS ONE*, 13(3), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193652>

Ringø, E.; Zhou, Z., Vecino, J. L.G., Wadsworth, S., Romero, J., Krogdahl, Olsen, R. E., Dimitroglou, A., Foey, A.; Davies, S., Owen, M., Lauzon, H. L., Martinsen, L. L., De Schryver, P., Bossier, P., Sperstad, S., Merrifield, D. L. (2016). Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story?. *Aquaculture nutrition*, 22; 219–282. <https://doi.org/10.1111/anu.12346>

- Ringø, E., Hoseinifar, S. H., Ghosh, K., Doan, H. Van, Beck, B. R., & Song, S. K. (2018). Lactic acid bacteria in finfish-An update. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–37. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01818>
- Rodríguez, J. L., & Peleteiro, J. B. (2014). Cultivo del lenguado senegalés.Fondo observatorio Español de Acuicultura. ISBN: 978-84-939800-5-4.
- Roquigny, R., Mougin, J., Bris, C. Le, Bonnin-jusserand, M., & Doyen, P. (2021). Characterization of the marine aquaculture microbiome : A seasonal survey in a seabass farm. *Aquaculture*, 531, 735987. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735987>
- Rubio, T., Oyanedel, D., Labreuche, Y., Toulza, E., Luo, X., Bruto, M., & Chaparro, C. (2019). Species-specific mechanisms of cytotoxicity toward immune cells determine the successful outcome of *Vibrio* infections. *Proc Natl Acad Sci USA*. 116(28). <https://doi.org/10.1073/pnas.1905747116>
- Rurangwa, E., Sipkema, D., Kals, J., & Veld, M. (2015). Impact of a novel protein meal on the gastrointestinal microbiota and the host transcriptome of larval zebrafish *Danio rerio*. *Front Physiol*, 6(4), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00133>
- Sánchez P. (2012). Growth and size variation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Tesis doctoral. Universitat Politècnica de Catalunya.
- Sáenz de Rodrigáñez, M. A., Díaz-Rosales, P., Chabrilón, M., Smidt, H., Arijo, S., León-Rubio, J. M., Alarcón, F. J., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., Cara, J. B., & Moyano, F. J. (2009). Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture Nutrition*, 15(2), 177–185. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2095.2008.00581.X>
- Sandaa, R., Brunvold, L., Magnesen, T., & Bergh, Ø. (2008). Monitoring the opportunistic bacteria *Pseudoalteromonas* sp. LT-13 in a great scallop, *Pecten maximus* hatchery. *Aquaculture*, 276, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.007>
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Horn, D. J. Van, & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent , Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Shearer, M. J., & Okano, T. (2018). Key pathways and regulators of Vitamin K function and intermediary metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 38(5), 127–151. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082117-051741>
- Schurgers, L.J.; Vermeer, C. (2002). Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects. *Biochim. Biophys*, 1570, 27–32.
- Simes, D. C., Viegas, C. S. B., Araújo, N., & Marreiros, C. (2020). Vitamin K as a diet supplement with impact in human health: Current evidence in age-related diseases. *Nutrients*, 12(1), 1–24. <https://doi.org/10.3390/nu12010138>

Stecher, B., Maier, L., & Hardt, W. D. (2013). "Blooming" in the gut: How dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 277–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2989>

Tagawa, M., and Aritaki, M., 2005. Production of symmetrical flatfish by controlling the timing of thyroid hormone treatment in spotted halibut *Verasper variegatus*. *General and Comparative Endocrinology* 141, 184-189.

Tapia-paniagua, S. T., Chabrilón, M., Díaz-Rosales, P., García, I., Banda, D., Lobo, C., Balebona, M. C., & Moriñigo, M. A. (2010). Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup , 1858) following probiotic administration. *Microb Ecol*, 310–319. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9680-z>

Tapia-Paniagua, S. T., Fumanal, M., Anguís, V., Fernández-Díaz, C., Alarcón, F. J., Moriñigo, M. A., & Balebona, M. C. (2019). Modulation of intestinal microbiota in solea senegalensis fed low dietary level of *Ulva ohnoi*. *Frontiers in Microbiology*, 10(2), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00171>

Tapia-Paniagua ST, Vidal S, Lobo C, Prieto-Álamo MJ, Jurado J, Cordero H, Cerezuela R, García de la Banda I, Esteban MA, Balebona MC, M. M. (2014). The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 209–221. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2014.08.019>

Tsugawa, N., & Shiraki, M. (2020). Vitamin K nutrition and bone health. *Nutrients*, 12(7), 1–16. <https://doi.org/10.3390/nu12071909>

Udagawa, M. (2001). The effect of dietary vitamin K (phylloquinone and menadione) levels on the vertebral formation in mummichog *Fundulus heteroclitus*. *Fisheries Science*, 67(1), 104–109. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2001.00205.x>

Vestrum, R. I., Attramadal, K. J. K., Vadstein, O., Gundersen, S., & Bakke, I. (2020). Bacterial community assembly in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*): contributions of ecological processes and metacommunity structure. *FEMS Microbiology Ecology*, 96 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa163>

Vidal, S., Tapia-Paniagua, S. T., Moriñigo, J. M., Lobo, C., García de la Banda, I., Balebona, M. del C., & Moriñigo, M. Á. (2016). Effects on intestinal microbiota and immune genes of *Solea senegalensis* after suspension of the administration of *Shewanella putrefaciens* Pdp11. *Fish and Shellfish Immunology*, 58, 274–283. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2016.09.010>

Villalta, M., Estévez, A., & Bransden, M. P. (2005). Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture*, 245(1–4), 193–209. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.035>

Walther, B., & Chollet, M. (2017). Menaquinones, Bacteria, and Foods: Vitamin K2 in the Diet. In *Vitamin K2 - Vital for Health and Wellbeing*. *Tech*. <https://doi.org/10.5772/63712>

Xiong J, Zhu J, Dai W, Dong C, Qiu Q, Li C. (2017). Integrating gut microbiota immaturity and disease-discriminatory taxa to diagnose the initiation and severity of shrimp disease. *Environ Microbiol*. 2017 Apr;19(4):1490-1501. doi: 10.1111/1462-2920.13701

Yabanc, N., & Sciences, H. (2020). Possible beneficial effects of vitamin K and osteocalcin on glucose metabolism. *Turkish Med Stud J*, 7(2), 106–113. <https://doi.org/10.4274/tmsj.galenos.2020.07.02.08>

Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Ludwig, W., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., & Glo, F. O. (2014). The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. 42(November 2013), 643–648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>

Yoon, S., Ha, S., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud : a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>

Yukgehnaish, K., Kumar, P., Sivachandran, P., & Marimuthu, K. (2020). Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. 1–25. <https://doi.org/10.1111/raq.12416>

Zhu, J., Miller, M. B., Vance, R. E., Dziejman, M., Bassler, B. L., & Mekalanos, J. J. (2002). Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. 99(5), 3129–3134.

Zorrilla I, Arijo S, Chabrillon M, Diaz P, Martinez-Manzanares E, Balebona MC, Moriñigo MA. (2003) *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *J Fish Dis*. 2003, 26(2), 103-8. doi: 10.1046/j.1365-2761.2003.00437.x.

11. ANEXOS

Tabla A. Resumen de los valores del análisis de componentes principales (PCA).

Componente	Eigenvalue	Proporción de valor	Proporción acumulada
PC1	18.29	53.81%	53.81%
PC2	4.747	13.96%	67.77%
PC3	4.238	12.46%	80.23%
PC4	2.774	8.16%	88.39%
PC5	2.19	6.44%	94.83%
PC6	1.135	3.34%	98.17%
PC7	0.622	1.83%	100.00%

Tabla B. Valores de cargas a nivel de género del análisis de componentes principales (PCA).

Género	Componente 1	Componente 2
Neptunomonas	-0.99	0.09
Kiloniella	-0.99	0.07
Roseovarius	-0.99	0.05
Carboxylicivirga	-0.99	0.09
Arcobacter	-0.98	-0.14
Colwellia	-0.98	-0.03
Cohaesibacter	-0.98	-0.12
Ruegeira	-0.97	0.17
Yersinia	-0.93	-0.31
Desulfopila	-0.93	-0.3
Brevirhabdus	-0.92	-0.33
Marinicella	-0.9	0.33
Thalassolituus	-0.89	0.37
Pseudomonas	-0.88	-0.35
Pseudoalteromonas	-0.86	0.31
Aliiroseovarius	-0.86	-0.39
Aeromonas	-0.8	-0.24
Desulfobulbus	-0.79	-0.5
Terasakiella	-0.78	0.5
Klebsiella	-0.72	-0.45
Cedecea	-0.65	-0.18
Thalassomonas	-0.53	0.7
Vibrio	-0.51	0.74
Escherichia_Shigella	-0.44	0.7
Janthinobacterium	-0.27	-0.46
Paracoccus	-0.1	0.4
Staphylococcus	-0.08	0.13
Sphingomonas	-0.05	0.25
Delftia	0	-0.47
Shewanella	0.15	-0.23
Brevundimonas	0.23	0.38
Methylobacterium	0.26	-0.58
Kluyvera	0.37	0.36
Roseomonas	0.39	-0.34

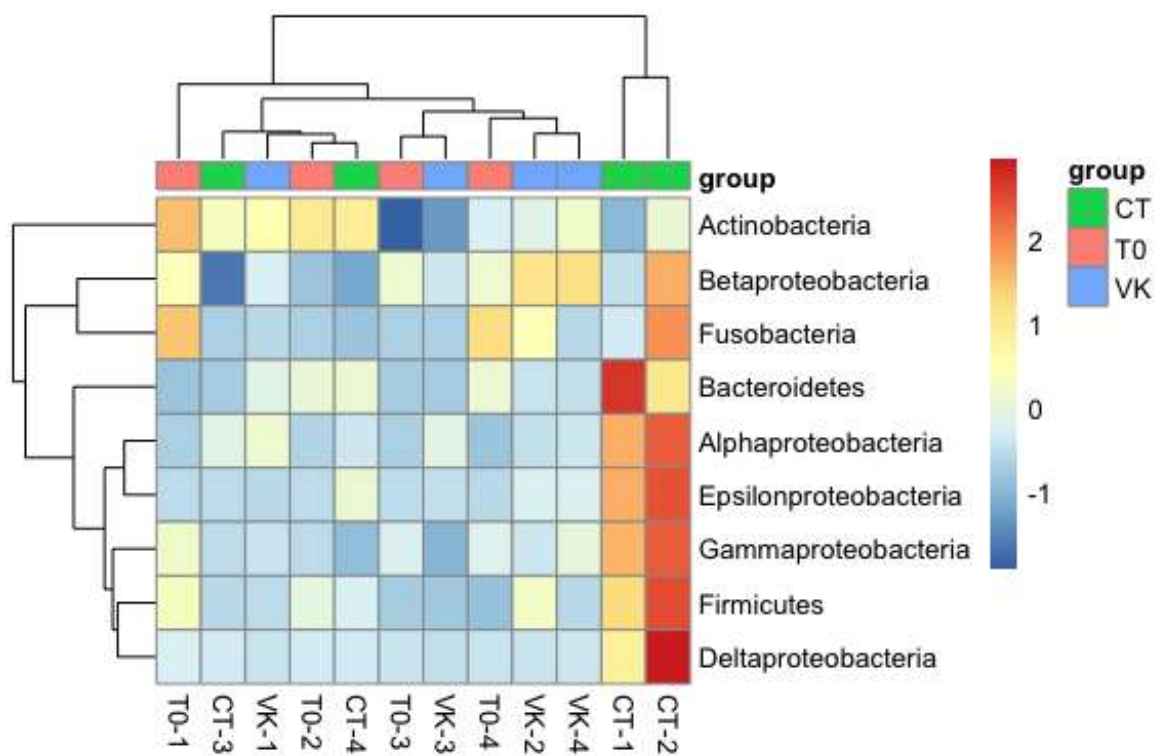


Figura A. *Heatmap* a nivel de phylum y clases de proteobacteria de los grupos T0, CT y VK. El gráfico está basado en puntuaciones Z (Z-score). Los dendrogramas dobles se basan en la agrupación jerárquica de la media.

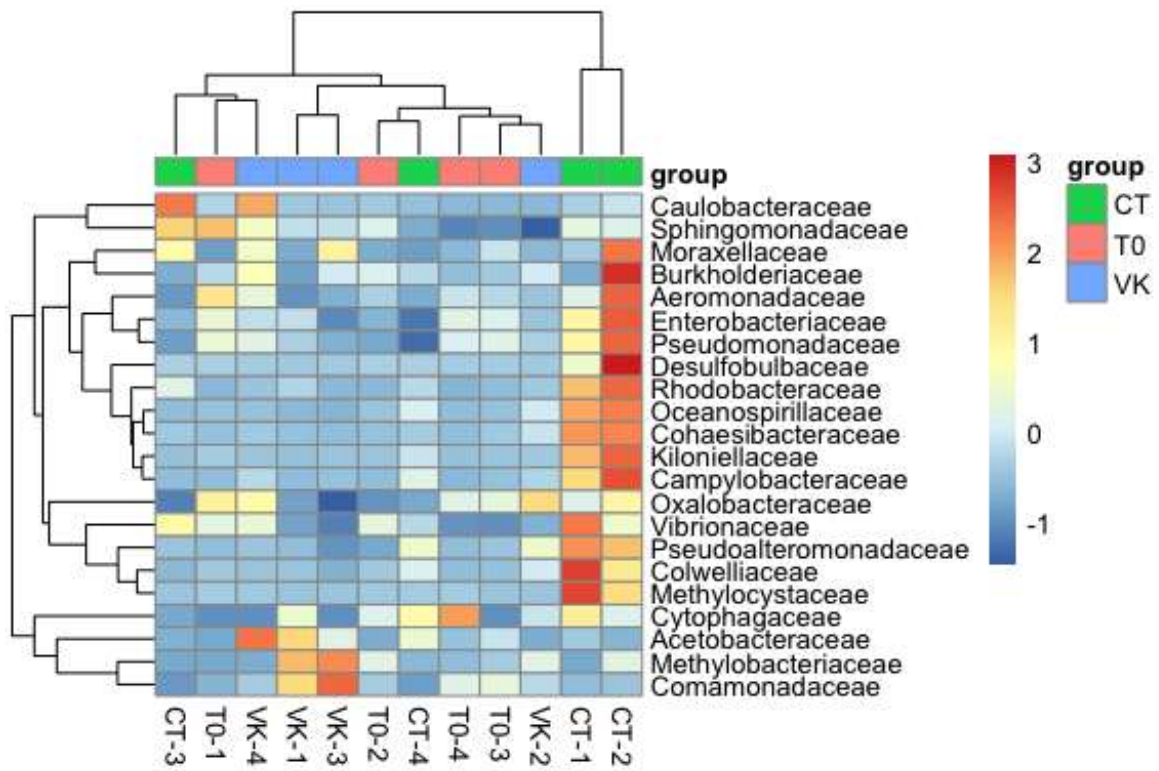


Figura B. *Heatmap* de las familias más abundantes de cada grupo T0, CT y VK. El gráfico está basado en puntuaciones Z (*Z-score*). Los dendrogramas dobles se basan en la agrupación jerárquica de la media.