



DESCARTE

UCH-Fc
Biotecnología
C 357
C-1

UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

**“EFECTO DE LA INCLUSIÓN DIETARIA DE SOYA FERMENTADA
SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA E INFLAMACIÓN
INTESTINAL EN *Salmo salar*”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

NATALIA BELÉN CATALÁN TOLEDO

Director del Seminario de Título: Jaime Romero Ormazábal

Co-Director: Carolina Ramírez Saavedra

Patrocinante: David Véliz Baeza

JULIO 2016
Santiago – Chile





INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

NATALIA BELÉN CATALÁN TOLEDO

**“EFECTO DE LA INCLUSIÓN DIETARIA DE SOYA FERMENTADA
SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA
E INFLAMACIÓN INTESTINAL EN *Salmo salar*”**

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dr. Jaime Romero Ormazábal
Director Seminario de Título

Dra. (c) Carolina Ramírez S.
Co-Directora Seminario de Título

Dr. David Véliz B.
Patrocinante

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Presidente

Dra. Natalia Lam Pasten
Integrante

Santiago de Chile, julio 2016

BIOGRAFÍA



Me llamo Natalia Belén Catalán Toledo y nací en Santiago de Chile el 09 de agosto de 1989, provengo de una familia compuesta por dos hermanos; Luis Felipe y Priscila Andrea, mi padre Luis Germán y mi madre Sussy Lucía, todos actualmente radicados en Santiago, salvo mi hermano menor, que decidió emigrar a Europa, donde vive hace más de un año.

Mis años de educación media transcurrieron sin mayores sobresaltos en el Liceo Carmela Carvajal de Prat, en Providencia, pese al inicio de los movimientos estudiantiles que se gestaban en el país.

Sin tener muy claro, ni definida mi vocación por completo, decidí postular a la carrera de Bachillerato en Ciencias, ya que desde siempre el mundo de la investigación se me había hecho fascinante. En el año 2009 ingresé a la carrera Ingeniería en Biotecnología Molecular.

Hoy, Julio de 2016 me encuentro en la gran puerta de salida al mundo para poder aplicar lo que he aprendido durante estos años de universidad y, si bien esta nueva etapa seguramente estará llena de desafíos, me siento capaz de enfrentar.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA	II
ÍNDICE DE CONTENIDOS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
1.- ACUICULTURA	1
2.- SOYA	2
3.- RESPUESTAS GÉNICAS DEBIDO A CAMBIOS EN LA DIETA	5
4.- MICROBIOTA	6
5.- MÉTODO DE ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS	8
6.- OBJETIVOS	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
1.- CONDICIONES DE CULTIVO DE PECES	11
2.- DIETAS EXPERIMENTALES	11
3.- PROCEDIMIENTO DE MUESTREO	12
4.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MICROBIOTA INTESTINAL	13
5.- CUANTIFICACIÓN DE COMPONENTES DE MICROBIOTA INTESTINAL	15
6.- EVALUACIÓN DE SEÑALES DE INFLAMACIÓN, ABSORCIÓN DE NUTRIENTES E INTEGRIDAD DE LA MUCOSA DEL INTESTINO	16
7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
RESULTADOS	18
1.- IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE SALMÓNIDOS ALIMENTADOS CON DIETA COMERCIAL, HARINA DE SOYA Y HARINA DE SOYA FERMENTADA	18
2.- CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS TOTALES Y GÉNEROS ESPECÍFICOS	21
3.- EFECTO DE LA INCLUSIÓN DIETARIA DE SOYA Y SOYA FERMENTADA EN LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS AL SISTEMA INMUNE EN INTESTINO Y SALUD INTESTINAL	22
DISCUSIÓN Y PROYECCIONES	27
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición nutricional de dietas experimentales.	13
Tabla 2: Partidores amplificación PCR y qPCR.	15
Tabla 3: Identificación de bandas TTGE de géneros bacterianos asociados a muestras obtenidas de peces alimentados con dietas experimentales (FM, SBM, FSBM).	21

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Perfiles de TTGE de microbiota presente en contenido intestinal de *S. Salar* sometidos a la inclusión dietaria de SBM y FSBM. 20
- Figura 2:** Cuantificación géneros bacterianos presentes en contenido intestinal de *S. salar* sometidos a la inclusión dietaria de SBM y FSBM. 23
- Figura 3:** Expresión relativa de citoquinas IL-1 β , IL-8 y TNF α en intestino de *S. salar* sometidos a la inclusión dietaria de SBM y FSBM. 25
- Figura 4:** Expresión relativa de genes asociados a absorción de nutrientes e integridad de la mucosa intestinal de *S. salar* sometidos a la inclusión dietaria de SBM y FSBM. 27

RESUMEN

Chile es el segundo exportador de salmónidos a nivel mundial, solo superado por Noruega. Los mayores costos de producción de salmón están asociados al alimento y, para hacer a esta industria más sustentable respecto al uso de los recursos silvestres, se busca el reemplazo de los insumos marinos por ingredientes vegetales en la dieta. Sin embargo, el reemplazo de harina de pescado por ingredientes vegetales como la harina de soya (SBM) puede traer consecuencias en las estructuras intestinales afectando la microbiota intestinal, la nutrición y la salud de los peces. En este seminario de título se abordará la caracterización de la microbiota intestinal de salmónes sometidos a dietas experimentales que incluyen harina de soya (SBM) o harina de soya fermentada (FSBM), resultados que se contrastarán con la microbiota presente en *S. salar* alimentados con dieta control formulada con harina de pescado (FM). Para realizar esta evaluación, se utilizó una estrategia molecular basada en el análisis del ADN extraído desde muestras de contenido intestinal. El análisis de composición de microbiota se realizó, mediante electroforesis en gel con gradiente temporal de temperatura (TTGE), permitiendo determinar los perfiles de las poblaciones bacterianas presentes en el contenido intestinal asociado a las diferentes dietas. La identificación de los componentes de estos perfiles se alcanzó mediante secuenciación de las bandas, lo que permitió identificar los géneros más interesantes. Los resultados fueron complementados con análisis de abundancia de estos grupos, en cada una de las condiciones de dieta ensayadas (FM, SBM y FSBM) utilizando qPCR. Esta evaluación indicó que *Shewanella*, componente frecuente de la microbiota de salmónidos, se ve afectada por la dieta y su carga es significativamente menor con respecto al control en ambas dietas experimentales. En contraste, géneros bacterianos

correspondientes a bacterias lácticas propuestos como posibles probióticos, entre ellos *Lactobacillus* y *Lactococcus*, presentaron un significativo aumento de su carga en la dieta con soya fermentada (FSBM). Además, el género *Pediococcus* solo fue visible en el contenido intestinal de peces en cuya dieta se incluyó FSBM. De esta forma, la soya fermentada induce un notable cambio en la microbiota intestinal, favoreciendo la presencia y el aumento de bacterias del phylum *Firmicutes*, en especial, bacterias ácido lácticas.

Además, se complementaron los análisis de microbiota, evaluando el efecto de las dietas sobre señales de inflamación a nivel de intestino proximal, utilizando como parámetros la expresión de las citoquinas IL-1 β , TNF α , IL-8, y los genes muc2, fabp2a1, pcna y aqp8ab, medidas por PCR en tiempo real. El perfil de citoquinas indica que la FSBM induce más señales inflamatorias que la dieta con SBM. Sin embargo, los genes relacionados con nutrición e integridad de la mucosa son inducidos por el uso de FSBM en los tiempos iniciales del tratamiento dietario. En vista de estos resultados, la inclusión de FSBM en la dieta de *Salmo salar* juveniles es menos perjudicial que la soya no tratada, para la salud intestinal del pez.

ABSTRACT

Chile is the second exporter of salmon in the world, surpassed only by Norway. The highest production costs of salmonids are associated to food and, in order to make the industry more sustainable compared to natural resources, it is desired to replace sea supplies for plant supplies. However, fish meal replacement for plant meals like soybean meal (SBM) may have consequences on the intestinal structures affecting the intestinal microbiota, affecting nutrition and health status in fish. In this seminar, gut microbiota characterization of salmonids under experimental diets, including soybean meal (SBM) or fermented soybean meal (FSBM), will be approached, whose results will be compared with gut microbiota of *S. salar* fed with control diet formulated with fish meal (FM). For this goal, a molecular strategy based on DNA analysis extracted from the gut content was used. For composition analysis, was used temperature gradient gel electrophoresis (TGGE), allowing to determine the profile of bacterial population present in the gut content associated to different diets. Identification of the components of the diets were obtained through band sequencing, and this led to identification of most interesting genus. The results were supplemented with an absolute abundance analysis of these groups in each diet condition tested (FM, SBM and FSBM) using qPCR. This assessment showed that *Shewanella*, frequent component of salmonid microbiota is affected by diet and its load is significantly lower compared to the control in both experimental diets. In contrast, bacterial genera corresponding to lactic acid bacteria proposed as possible probiotics, including bacterial genera *Lactobacillus* and *Lactococcus*, showed a significant increase in its load in the diet with fermented soybeans (FSBM). In addition, *Pediococcus* genus was visible only in the gut contents of salmonids fed with FSBM. In this manner, FSBM induces a notable change in gut

microbiota, favoring presence and increase of bacteria belonging to the *Firmicutes* phylum, especially lactic acid bacteria.

Then, microbiota analysis were complemented assessing the effect of diets on inflammatory signaling at the level of proximal intestine, using the expression of cytokines IL-1 β , TNF α , IL-8 and genes muc2, fabp2a1, pcna and aqp8ab as parameters measured by real time PCR. Cytokine profile indicates that the diet including FSBM induces more inflammatory signals than the SBM diet. However, nutrition and related mucosal integrity genes are induced by the use of FSBM in the early days of dietary treatment. In view of these results, the inclusion of FSBM in the diet of juvenile *Salmo salar* is less harmful than untreated soybeans, for intestinal health of the fish.

INTRODUCCIÓN

1.- Acuicultura

La acuicultura engloba la producción de diversidad de peces, mariscos y algas en todos los ambientes acuáticos. El desarrollo de esta actividad en el mundo ha mostrado un incremento importante, transformándose en una de las actividades con mayor crecimiento dentro de la industria alimentaria global, a una tasa media anual de 6,2% desde el 2000 hasta el 2012, mientras que, la pesca registró un escaso aumento en la producción. Este fenómeno tiene directa relación con el aumento excesivo de la población a nivel mundial y de la búsqueda de nuevas fuentes de alimentos beneficiosos que aporten proteínas requeridas en la dieta. Actualmente la acuicultura representa cerca del 50% de la producción de peces consumidos en el mundo (FAO, 2014). Sin embargo, este aumento en la producción acuícola depende en alguna medida de la pesca, pues las fuentes de proteínas en la alimentación, provienen de la utilización de harinas y aceites de pescado, los llamados “insumos marinos” (Naylor y col., 2000).

Chile es un importante productor acuícola, sus principales productos son los salmónidos (salmón del Atlántico, trucha, y salmón coho). Según la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, la cosecha acumulada de salmón del Atlántico en junio del 2014 en Chile, fue de 268,7 mil toneladas, superando por un 12% a lo acumulado en la misma fecha el año 2013. Una de las limitantes para la expansión de esta industria son los costos de producción, asociados a alimentación de los peces y al tratamiento de enfermedades (Caligus y SRS). Uno de los principales ingredientes en el alimento de

salmónidos es la harina de pescado por su alto contenido proteico (aproximadamente 70% de proteína) y de omega 3 (alrededor del 10%), pero sus valores están cercanos a 2000 dólares la tonelada. Además, debido a que esta fuente de proteínas proviene de la pesca, se genera un problema de sustentabilidad, ya que a medida que la demanda por proteína para varios usos aumenta, se produce un aumento en la demanda de harina de pescado, incrementándose su valor. Por estas razones, se busca el reemplazo de los insumos marinos por ingredientes vegetales de menor valor.

2.- Soya

Los mayores costos de producción en salmonicultura están asociados a la alimentación de los peces (entre 50% y 60% del total de los costos), produciéndose un problema de sustentabilidad al depender de la pesca, que está asociada a una presión importante sobre los recursos marinos silvestres. Por lo tanto, el desafío consiste en buscar fuentes de proteínas que permitan el cultivo de peces de alto valor comercial, como el salmón, con menores costos y manteniendo buenas condiciones de desarrollo de los peces y propiedades nutricionales. Surge así la idea de incluir harina de soya (*Glycine max*) en la dieta de estos peces, debido a su alto contenido proteico (461-562 g/Kg de proteína; Gatlin y col., 2007), su balanceado perfil aminoacídico (Nordrum y col., 2000; Friedman & Brandon, 2001), la disponibilidad y el bajo precio (600 dólares por tonelada). No obstante, esta alternativa trae problemas asociados a la digestibilidad provocados por la presencia de factores antinutricionales (FAN) en la soya (Fuentes-Appelgren y col., 2014). Entre los FAN más reconocidos están los oligosacáridos y polisacáridos no almidón, inhibidores de tripsina, fitatos, glucosinolatos, lectinas y saponinas (Francis y col., 2001).

Las dietas altas en soya pueden provocar disminución del crecimiento, disminución en el consumo de alimento y problemas en la digestibilidad de nutrientes en salmónidos (Merrifield y col., 2011). Se ha sugerido que las dietas que contienen harina de soya, poseen FAN que podrían provocar la inflamación intestinal en peces, fenómeno conocido como enteritis del salmón. Los signos típicos asociados a la enteritis inducida por harina de soya en la mucosa intestinal de salmón del Atlántico, se describen como el acortamiento de la mucosa, produciendo un plegamiento con una consecuente disminución de la capacidad de absorción de los enterocitos que recubren el epitelio, y produciéndose pérdida de la vacuolización normal supranuclear, un engrosamiento lámina propia y mucosa sub-epitelial con una infiltración severa de células inflamatorias, en particular de los macrófagos y granulocitos eosinófilos y, el aumento de número de células caliciformes en el epitelio (Urán y col., 2008).

Sin embargo, no existe claridad aún sobre cuáles componentes de la harina de soya son los agentes causantes específicos de la enteritis. Los candidatos propuestos son saponinas y proteínas de soya (conglucina, lectinas). Las saponinas corresponden a glucósidos de esteroides y presentan propiedades tensoactivas, logrando alterar las membranas biológicas. En *S. salar*, se describió que las saponinas son resistentes a la degradación durante el paso por el tracto digestivo (Knudsen y col., 2007). Se ha descrito también, que la saponina aumenta la permeabilidad de las membranas de los enterocitos lo que inhibe el transporte activo, promoviendo la exposición de la mucosa a partículas con propiedades "antigénicas" (Johnson y col., 1986). Con respecto a las globulinas que se encuentran en la soya, se han propuesto como un agente que podría participar en el desarrollo de la enteritis en peces, debido a que poseen un grado de

antigenicidad. Se ha estudiado el efecto de β -conglucina y resulta que es un estimulante de la expresión de genes asociados a la respuesta inmune inflamatoria, tales como interleuquina 1 (IL-1), Factor de necrosis tumoral (TNF α) y factor de crecimiento transformante beta (TGF β) en la región distal del intestino de peces (Zhang y col., 2013).

Existen varios estudios acerca de la enteritis generada a partir de la inclusión de soya en la dieta de especies carnívoras, principalmente trucha arcoíris y salmón del Atlántico (Ostaszewska y col., 2005; Knudsen y col., 2007; Chikwati y col., 2012), por lo cual se cree que el mecanismo que opera tiene rasgos similares en diferentes peces. Se ha reportado además, que el reemplazo de harina de pescado por harinas vegetales en la alimentación de peces provoca cambios en la composición de la microbiota intestinal (Reveco y col., 2014; Ringo y col., 2006; 2008).

Con el objetivo de disminuir el efecto de los factores antinutricionales se ha buscado utilizar soya procesada por diversos métodos. Opazo y col. (2012) describen que la harina de soya fermentada por bacterias de los géneros *Streptomyces*, *Cohnella* y *Cellulosimicrobium*, contiene menores niveles de factores antinutricionales (24% NSPs, 83% estaquiosa y 69% rafinosa) y aumenta el contenido de proteínas, con respecto a harina de soya sin tratamiento. No obstante, su uso en salmones no ha sido reportado y no se conoce su efecto sobre la inflamación. Adeyemo & Oinlude (2013) lograron disminuir la concentración de taninos, fitatos e inhibidor de proteasa, utilizando *Lactobacillus plantarum* para fermentar la harina de soya. Sin embargo, se ha evaluado la inclusión de harina de soya fermentada en la dieta de trucha arcoíris juvenil, donde se probaron dietas con hasta 50% de reemplazo de harina de pescado, y se determinó

que no hay diferencias significativas en el aumento de peso ni en la tasa de conversión de alimento en las dietas que contienen hasta 30% de soya fermentada, y no se presentan signos de inflamación en el intestino, utilizando bacterias *Aspergillus spp.* y *Bacillus spp.*, para el proceso de fermentación (Barnes y col., 2012)

3.- Respuestas génicas debido a cambios en la dieta

La enteritis involucra cambios morfológicos en el intestino de peces y se asocia a señales de inflamación que reclutan granulocitos a la mucosa intestinal. Entre estas señales se encuentran algunas citoquinas pro-inflamatorias tales como interleuquina IL-1 β , la interleuquina IL-8 y el factor de necrosis tumoral (TNF α) (Abid y col., 2013, Hedreda y col., 2013). Debido a la inflamación se pierden algunas funciones del intestino relacionadas con la digestibilidad de nutrientes. La pérdida de estas funciones ha sido evaluada previamente midiendo, los niveles de transcripción de algunos genes que codifican para transportadores de nutrientes, en peces alimentados con diferentes niveles de inclusión dietaria de harina de soya (Sahlmann y col., 2013). Por ejemplo, se han estudiado los genes que codifican para la proteína acuaporina 8ab (*aqp8ab*) y proteína de unión a ácidos grasos 2a1 (*fapb2a1*) que se relacionan con la absorción de nutrientes en el intestino. Además se incluyen la proteína mucina 2 (*muc2*), y el antígeno nuclear de proliferación nuclear (*pcna*), relacionados con la salud de la mucosa. Es importante estudiar los efectos de la inclusión de ingredientes vegetales en la expresión de estos genes, debido al interés por incorporarlos a las dietas de salmónidos y otros peces carnívoros (Krogdahl y col., 2015).

Las acuaporinas están involucradas en el transporte de agua a través de membranas biológicas y están presentes en todos los organismos vivos pues son fundamentales para la homeostasis celular, estas proteínas pueden facilitar la absorción de agua en el intestino del pez cuando se aclimata a agua de mar. Aqp8ab está fuertemente sobre regulado en segmentos intestinales durante esta aclimatación, lo que indicaría su rol en el equilibrio del agua (Engelund y col., 2013). También existen proteínas de unión a ácidos grasos (Fabp) que son transportadores de ácidos grasos de cadena larga en citoplasma y se expresan principalmente en las células del intestino (Kaitetzidou y col., 2015). Las mucinas son los principales componentes de la mucosa, formando estructura oligoméricas que otorgan propiedades viscoelásticas a la mucosa. Para un funcionamiento normal, se requiere de un equilibrio entre el volumen y la composición de la mucosa. En particular Muc 2 es secretada al medio extracelular y posee propiedad gelificante (Voynow & Rubin 2009). Su función es proporcionar una barrera protectora entre las superficies epiteliales y el lumen intestinal (Allen y col., 1998). El antígeno nuclear de células en proliferación (Pcna) rodea el ADN y su rol es participar en el metabolismo de ácidos nucleicos, formando parte de la maquinaria de replicación y reparación. Su función más definida es de factor de posesividad (Kelman, 1997) y se utiliza como un marcador de un potencial daño en el intestino, cuando ocurre aumento en la expresión de *pcna*, se asocia al desarrollo de tejido neoplástico (Dezfuli y col., 2012).

4.- Microbiota

El intestino es un órgano complejo y multifuncional, donde se genera una interacción entre el ambiente y el cuerpo de los peces. En él se produce el proceso de digestión y

la absorción de alimento y nutrientes, el intestino es fundamental para el equilibrio hídrico y electrolítico, la regulación endocrina de la digestión, el metabolismo y la inmunidad. Actúa como la primera barrera de defensa en el cuerpo, además se caracteriza por su alta densidad poblacional de microorganismos, donde predominan las bacterias (Denev y col., 2009). En el tracto gastrointestinal se generan las condiciones para el desarrollo de un ecosistema microbiano complejo denominado microbiota intestinal. La microbiota corresponde a un complejo y dinámico ecosistema de microorganismos que no causa daños al hospedero, a pesar de estar en continuo contacto con sus tejidos o colonizando el tracto gastrointestinal (Nayak, 2010). A la microbiota intestinal se le atribuyen efectos benéficos para el hospedero, como su aporte en la nutrición complementando procesos de digestión, contribuyendo al metabolismo o jugando un papel protector al prevenir la colonización por patógenos, controlando su crecimiento y modulando el sistema inmune del hospedero (Kesarcodi-Watson y col., 2008; Rawls y col., 2004; Ringø y col., 2006; Hovda y col., 2007). Por lo tanto, la estabilidad de la microbiota se presenta como un factor importante en la resistencia natural de los peces, a las infecciones producidas por bacterias patógenas en el tracto digestivo (Ringø y col., 2003). Se han descrito muchos factores que pueden influir en la composición de la microbiota intestinal, tanto en carga como en diversidad. Algunos de estos factores son hábitat, temperatura, salinidad, tipo de alimentación, etapa del desarrollo, especie (Ringø & Birkbeck, 1999; Verschuere y col., 2000; Izvekova y col., 2007). Debido a su importancia, se ha estudiado cómo la microbiota puede modificarse al incluir ingredientes de origen vegetal en las dietas de peces carnívoros.

Desai y col. (2012) observaron en *Oncorhynchus mykiss*, que las dietas con inclusión de ingredientes vegetales están asociadas a una mayor proporción de bacterias del phylum *Firmicutes* con respecto a *Proteobacterias*, cuando se compara con microbiota de peces alimentados con dieta en base a harina de pescado. Por otra parte, Navarrete y col. (2013) evaluaron la inclusión de soya y de bacterias ácido lácticas (BAL) en la dieta de *S. salar*, observando que la presencia de BAL disminuye la inflamación intestinal sin eliminarla. Además, mostraron que habían grupos bacterianos asociados a las distintas dietas; por ejemplo, la dieta control (harina de pescado) está correlacionada con *Pseudomonas*, *Lactococcus* y *Aeromonas*. En tanto, una dieta con harina de soya fue relacionada con los géneros bacterianos *Aeromonas* y *Sporocarcina*; mientras que para la dieta con inclusión de soya y BAL, la correlación fue con *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Lactococcus* y *Carnobacterium*. Notablemente, *Shewanella* estuvo presente en todas las dietas. Reveco y col. (2014) muestran que se produce una reducción en la diversidad bacteriana, en intestino distal de salmón del Atlántico cuando la dieta incluye soya, promoviendo una mayor abundancia relativa de bacterias pertenecientes al phylum *Firmicutes* respecto de la dieta consistente en harina de pescado.

5.- Método de estudio de las comunidades bacterianas

El estudio de comunidades bacterianas puede ser realizado mediante diversas técnicas. Además de las técnicas basadas en medios de cultivo clásicas, encontramos las estrategias basadas en el examen del ADN de la muestra. Entre estas últimas se cuentan electroforesis en gel con gradiente temporal de temperatura (TTGE) y electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE) que generan un perfil de las

bacterias dominantes en las muestras (Muyzer y col., 1993; Muyzer & Ramsing, 1995). Los métodos basados en el estudio de material genético (métodos moleculares), tienen ventajas sobre las técnicas de cultivo tradicionales (Navarrete y col., 2010), debido a que no es posible cultivar en condiciones de laboratorio la totalidad de bacterias, mientras que a través de las técnicas moleculares es posible identificar estas bacterias no cultivables.

Utilizando tanto TTGE como DGGE es posible separar mezclas de productos PCR con igual longitud pero distinta secuencia en base a distinto contenido de GC. La estrategia se basa en someter a los amplicones a una condición denaturante que logre la desnaturalización de los mismos, ya que este proceso está determinado por la secuencia de cada amplicón (%GC), su separación dependerá de cuánto puedan migrar en el gel antes de denaturarse. El ADN avanza por el gel hasta que alcanza la temperatura o concentración desnaturantes, por lo que su movilidad se reduce en el gel (Hill y col., 2000).

La identificación molecular de bacterias puede realizarse utilizando el análisis de genes ribosomales, generalmente el 16S ADN_r, usado ampliamente como referencia para determinar la ubicación taxonómica de un microorganismo (Austin, 2006; Huber y col., 2004). Varios estudios se han realizado utilizando estos métodos basados en PCR de ADN extraído han mostrado ser eficientes en el estudio de comunidades bacterianas gastrointestinales en peces (Romero & Navarrete, 2006; Hovda y col., 2007). El objetivo de esta estrategia de estudio, consiste principalmente en determinar a grandes rasgos las diferencias que se producen en las comunidades bacterianas provenientes

de diversos orígenes o tratamientos, y posteriormente poder identificar las especies bacterianas presentes en cada perfil generado en el TTGE.

6.- Objetivos

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto de la inclusión dietaria de soya fermentada sobre la composición de la microbiota de salmónidos y señales de inflamación en tejido intestinal del hospedero.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificar aquellos componentes de la microbiota que se ven afectados por la inclusión de la soya y soya fermentada en la dieta de *S. salar*.
2. Evaluar de manera cuantitativa los cambios en la microbiota debido a la inclusión de soya y soya fermentada en la dieta de *S. salar*.
3. Evaluar el efecto de la inclusión de soya y soya fermentada en señales de inflamación de tejido de intestino de *S. Salar*.
4. Evaluar el efecto de la inclusión de soya y soya fermentada en señales de absorción de nutrientes e integridad de la mucosa de tejido de intestino de *S. Salar*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Condiciones de cultivo de peces

Los ensayos de inclusión de soya y soya fermentada se realizaron en la Escuela de Acuicultura, Universidad Católica de Temuco, 500 ejemplares de salmón del Atlántico juveniles (peso inicial promedio = $50 \pm 5,5\text{g}$) fueron distribuidos al azar en 12 estanques de fibra de vidrio de 100L de capacidad, cada uno con una cámara de recolección de heces (sistema Guelph). Los peces se mantuvieron bajo un fotoperíodo de 12h luz y 10h oscuridad y aclimatados durante 10 días (alimentados con dieta control). Cada estanque fue suministrado con 1,8 L/min de agua fresca a temperatura constante (14°C). Todas las dietas experimentales fueron distribuidas al azar en los estanques y los peces fueron alimentados a mano 3 veces al día, 6 días a la semana hasta saciedad aparente. Los parámetros de calidad medioambiental y del agua fueron monitoreados en toda la duración de los períodos de experimentación y mantenidos en rangos normales para salmónidos.

2.- Dietas experimentales

Se prepararon tres dietas experimentales; una dieta control (FM) basada en harina de pescado y dos dietas con 30% de inclusión o de harina de soya (SBM) o harina de soya fermentada (FSBM), la que fue preparada de acuerdo a Opazo y col. (2012). El detalle de la composición de las dietas se encuentra disponible en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición nutricional de dietas experimentales.

	Dieta FM	Dieta SBM	Dieta FSBM
Harina de pescado	649,9	455,0	455,0
Harina de soya	0,0	300,0	0,0
Harina de soya fermentada	0,0	0,0	300,0
Harina de trigo	170,0	199,0	119,0
Aceite de pescado	151,0	105,7	105,7
Vitamina C	5,0	5,0	5,0
Premix de vitaminas ²	5,0	5,0	5,0
Sal TM ¹	10,0	10,0	10,0
Colina	6,0	4,2	4,2
Fosfato dicálcico	3,0	2,1	2,1
Óxido de itrio	0,1	0,1	0,1
Humedad (%)	5,5	6,0	4,5
Proteína (%)	53,8	51,4	53,6
Grasa (%)	20,9	15,6	14,5
Ceniza (%)	11,5	10,1	10,6
E.N.N (%)	13,1	20,9	18,8
Energía Bruta (MJ/kg)	23,2	21,9	21,6
Rafinosa (%)	0,07	0,415	0,05
Estaquiosa (%)	0,005	1,310	0,01
Verbascosa (%)	0,0	0,06	0,0

¹Suministra lo siguiente por kg de dieta seca: KI, 1.9 mg; MnSO₄.H₂O, 75.8 mg; ZnSo₄.7H₂O, 132.0 mg; Na₂SeO₃, 0.88 mg; CoCl₃.6 H₂O, 4.0 mg; CuSO₄.H₂O, 11.8 mg; FeSO₄.H₂O, 298.5 mg.

²Suministra lo siguiente por kg de dieta seca: mononitrato de tiamina, 62mg; riboflavina, 71mg; niacina, 294mg; pantotenato de calcio, 153mg; clorhidrato de piridoxina, 50mg; ácido fólico, 22mg; vitamina B12, 0,08mg; d-biotina, 0,8mg; mioinositol, 176mg; retinol acetato, 8818 IU; vitamina D3, 588mg; α-acetato tocoferol, 670mg; complejo menadiona bisulfito de sodio, 37mg.

3.- Procedimiento de muestreo

Todos los peces fueron manejados de acuerdo a los parámetros aprobados por el Comité de Bioética y Bioseguridad INTA, Universidad de Chile (2012-018). Se

recolectaron muestras de contenido intestinal luego de 50 días de alimentar a los peces con dieta FM, SBM y FSBM.

Por otro lado, las muestras de tejido intestinal fueron tomadas en 4 tiempos; que corresponden a 5, 10, 20 y 50 días luego de comenzado el tratamiento. Se tomaron 3 muestras de tejido intestinal de peces alimentados con dieta FM, SBM y FSBM.

4.- Caracterización molecular de microbiota intestinal

Las muestras de contenido intestinal provenientes de salmones expuestos a las distintas dietas, se sometieron a extracción de ADN utilizando kit Powersoil de MoBio siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las comunidades bacterianas se determinaron mediante electroforesis en gel con gradiente temporal de temperatura (TTGE) de acuerdo a Magne y col. (2006). Para ello se realizó amplificación por PCR de la región V2-V4 del gen 16S ADNr con los partidores 341GC y 788R (Tabla 2). Los amplicones resultantes fueron evaluados por TTGE, y luego las bandas de cada muestra se cortaron y eluyeron en agua libre de nucleasas, para finalmente ser amplificadas por PCR de la región anteriormente descrita (341F-788R). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 30 μ l que contiene: 0,2 mM de cada desoxinucleotido trifosfato (dNTP), 0,05 U/ μ l de Taq ADN polimerasa, 3 μ l de buffer 10X, 2,0 mM de MgCl₂ y 0,3 μ l de cada partidor a una concentración 0,25 pmol/ μ l, finalmente 1 μ l de ADN. El perfil térmico fue 94°C durante 10min, luego 30 ciclos a 97°C x 1min, 55°C x 1min y 72°C 1,5min, finalmente 72°C x 10min. Los amplicones se observaron luego de una electroforesis corrida a 200V durante 20

minutos, en gel de poliacrilamida al 8%, que fue visualizado con tinción de plata (Romero & Navarrete, 2006), luego se enviaron a secuenciar a Macrogen USA.

Las secuencias del gen 16S ADNr fueron comparadas con la base de datos Ribosomal Database Project II, utilizando la herramienta Sequence Match (Cole y col., 2007) determinándose el porcentaje de identidad con la secuencia más cercana, utilizando el programa BioEdit.

Tabla 2: Partidores amplificación PCR y qPCR.

Blanco	Dirección	Secuencia (5'-3')	Referencia
16S	341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer y col. (1993) Therese y col. (1998)
	341GC	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGC	
	788R	GGACTACCAGGTATCTAA	
<i>Lactococcus</i>	Forward	CCGAGCGTTGTCCGGATTTA	Este trabajo
	Reverse	ACTCTCCTCTCCTGCACTCA	
<i>Lactobacillus</i>	Forward	GCCACATTGGGACTGAGACA	Este trabajo
	Reverse	AGCCGTGACTTTCTGGTTGA	
<i>Shewanella</i>	Forward	CAGGCGGTTTGTAAAGCGAG	Este trabajo
	Reverse	GTCAGTCTTTGTCCAGGGGG	
<i>Pediococcus</i>	Forward	ACTTCAATGCCGTGTTTAG	Este trabajo
	Reverse	ACCAAAGAATCTAACGGGA	
IL-8	Forward	GAATGTCAGCCAGCCTTGTC	Este trabajo
	Reverse	TCCAGACAAATCTCCTGACCG	
IL-1 β	Forward	CGTCACATTGCCAACCTCAT	Diseño del laboratorio de Biotecnología INTA
	Reverse	ACTGTGATGTACTGCTGAAC	
TNF α	Forward	GGCGAGCATACCACTCCTCT	Diseño del laboratorio de Biotecnología INTA
	Reverse	TGGACTCAGCATCACCGTA	
β -actina	Forward	CAACTGGGACGACATGGAGA	Este trabajo
	Reverse	AGTGAGCAGGACTGGGTGCT	
<i>muc2</i>	Forward	TCTGTCCTGATGGGATGAAAC	Este trabajo
	Reverse	GGACTCCAAACAAACGCAAT	
<i>pcna</i>	Forward	TGAGCTCGTCGTCGGGTATCTCT	Krogdahl y col. (2015)
	Reverse	GTCCTCATTCCCAGCACACT	
<i>aqp8ab</i>	Forward	GTTGGCATAGTTCTCCTTTGATG	Krogdahl y col. (2015)
	Reverse	TTTCAACCCTCCCTTACC	
<i>fabp2a1</i>	Forward	GGTGCTGAAAACCTACCAGAGCCA	Este trabajo
	Reverse	GGATTGAACGTAGCTCTTCTTGG	

5.- Cuantificación de componentes de microbiota intestinal

El recuento de bacterias totales presentes en el contenido intestinal se realizó mediante microscopía de epifluorescencia usando naranja de acridina como lo describe Romero & Espejo. (2001). Se utilizaron diluciones seriadas del contenido intestinal obtenido de cada dieta, y se expresó el resultado en bacterias/gr de contenido intestinal.

Los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Shewanella* y *Pediococcus* se cuantificaron mediante qPCR. Los partidores para la cuantificación se confeccionaron a partir de una secuencia consenso creada desde secuencias disponibles en National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). Utilizando la herramienta Primer-BLAST, se eligieron un par de partidores que fueron evaluados en el software AmplifX, con el objetivo de descartar el apareamiento entre ellos. Finalmente se evaluaron en el sitio Ribosomal Database Project para verificar que reconozcan los géneros seleccionados.

La eficiencia de los partidores se determinó mediante una curva de calibración para cada uno de los géneros de bacterias, usando diluciones 1:10 desde una muestra elegida al azar. El qPCR se realizó en un termociclador AriaMX (Agilent) de acuerdo a lo detallado en la Tabla 2. El volumen final de reacción de amplificación fue de 10µl, el cual contenía 5µl SYBR Green I Master2X (Roche), 3,5µl agua, 0,25µl de cada partidor, y 1µl de ADN templado, cada muestra se analizó por triplicado.

6.- Evaluación de señales de inflamación, absorción de nutrientes e integridad de la mucosa del intestino

Para evaluar la inflamación a nivel de intestino de los peces sometidos a las distintas dietas SBM y FSBM, se realizó cuantificación relativa de la expresión de genes asociados al sistema inmune, interleuquina 8 (IL-8), interleuquina 1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral (TNF α). Además se evaluó la expresión de algunos genes asociados a absorción de nutrientes y salud intestinal tales como; mucina 2 (muc2), antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), acuaporina 8ab (aqp8ab), proteína de unión a ácidos grasos 2a1 (fabp2a1), estos genes se estudiaron a partir de la metodología realizada por Krogdahl y col. (2015), utilizando β -actina como gen de referencia.

Todas las muestras de intestino de los individuos fueron homogenizadas. El total de RNA fue aislado desde las muestras usando TRIzol de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA desde tejido intestinal de peces se utilizó para la síntesis de ADNc usando Maxima H Minus First Strand cADN Synthesis Kit with dsDNase (Thermo Scientific) que contiene oligo dT como primer, siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras de ADNc fueron mantenidas a -80°C para ser usadas en la cuantificación por qPCR. Las reacciones de cuantificación fueron llevadas a cabo en un termociclador AriaMX (Agilent). Cada 10 μ l de reacción de amplificación contenía 5 μ l SYBR Green I Master2X (Roche), 3,5 μ l agua, 0,25 μ l de cada partidor, detallado en la Tabla 2, y 1 μ l de ADN templado, cada muestra se analizó por triplicado.

7.- Análisis estadístico

La cuantificación absoluta de bacterias del contenido intestinal de salmones, se analizó mediante el test estadístico no paramétrico t-test considerando las diferencias significativas ($P < 0,05$), con el programa GraphPad Prism, versión 6.0 (GraphPad Software Inc., 2013). La cuantificación relativa se obtuvo utilizando el método Pfaffl (Pfaffl y col., 2002) y el programa Rest 2009 (Qiagen) para determinar las diferencias producidas en la cuantificación relativa de genes. Se consideraron expresiones estadísticamente significativas aquellas con $p \text{ value} < 0,05$.

RESULTADOS

1.- Identificación de los componentes de la microbiota intestinal de salmónidos alimentados con dieta comercial, harina de soya y harina de soya fermentada

La microbiota del contenido intestinal de salmónes alimentados con dietas FM, SBM y FSBM, se estudió mediante TTGE de la región V2-V4 del gen 16S ADNr. La observación de los perfiles indica que hay diferencias en la composición de las poblaciones bacterianas cuando cambia la dieta. Es posible observar que en los perfiles derivados de las dietas FM y SBM hay mayor número de bandas comparado con la dieta FSBM, lo que podría indicar mayor diversidad de bacterias. Además, se ven bandas presentes tanto en la dieta FM como en SBM, en particular aquellas que corresponden a los géneros *Clostridium* y *Acinetobacter*. Por otra parte, en la dieta FSBM aparecen bandas que no están presentes en FM ni en SBM (Figura 1).

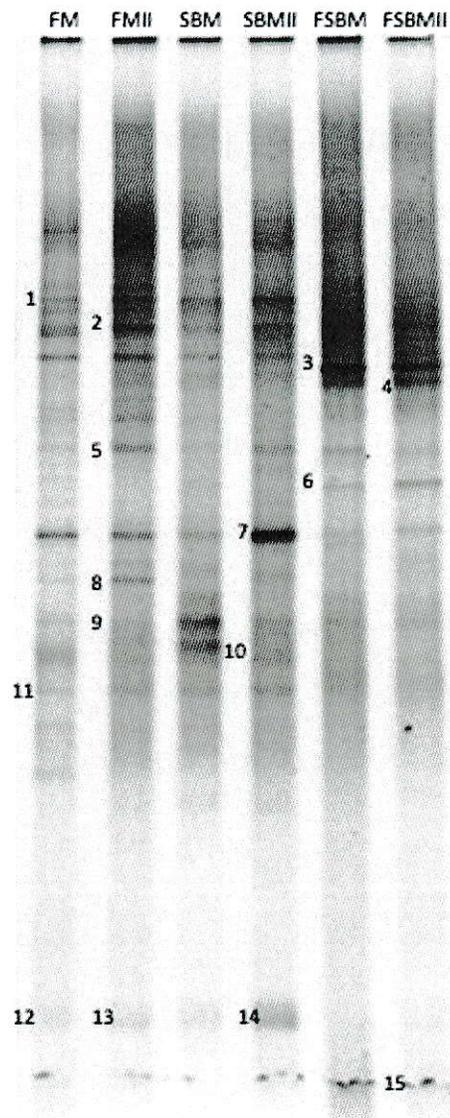


Figura 1: Perfiles de TTGE de microbiota presente en contenido intestinal de *S. Salar*, sometido a 3 dietas experimentales. Microbiota asociada a dieta control (FM), dieta con inclusión de soya (SBM), y dieta con inclusión de soya fermentada (FSBM), cada uno realizado con una réplica técnica. Los géneros asociados a las bandas marcadas con números son los siguientes: 1. *Clostridium sensu stricto*, 2. *Acinetobacter*, 3. *Lactobacillus*, 4. *Pediococcus*, 5. *Shewanella*, 6. *Lactobacillus*, 7. *Paracoccus*, 8. *Terribacillus*, 9. *Isoptericola*, 10. *Plantibacter*, 11. *Pseudomonas*, 12. *Isoptericola*, 13. *Rhodococcus*, 14. *Microbacterium*, 15. *Cellulosimicrobium*.

Los resultados de la secuenciación de las bandas se encuentran en la Tabla 3. En las muestras obtenidas de individuos alimentados con dieta FM se encontró que el 50% de las bandas corresponden a bacterias del phylum *Proteobacteria*, mientras *Actinobacteria* y *Firmicutes* corresponden al 25% cada uno. Mientras que en las muestras obtenidas de individuos alimentados con dieta SBM, se identificó 53% *Proteobacteria*, seguido de 34% de *Actinobacteria* y 13% *Firmicutes*. En contraste con lo observado, en las muestras de individuos alimentados con dieta FSBM se detectó 60% de *Firmicutes*, que corresponden principalmente a bacterias ácido lácticas, además de 20% de *Actinobacteria* y 20% de *Proteobacteria*. En resumen, en peces alimentados con dieta FM y dieta SBM predominaron las bacterias del phylum *Proteobacteria*, mientras que en el contenido intestinal de peces alimentados con dieta FSBM, predominó el phylum *Firmicutes*.

Tabla 3: Resumen identificación de bandas TTGE de géneros bacterianos asociados a muestras obtenidas de peces alimentados con dietas experimentales (FM, SBM y FSBM).

Banda	% identidad	Phylum	Género	Nº de	FM	SBM	FSBM
1	95	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium sensu stricto</i>	X95274.1	+	+	-
2	87.8	<i>Proteobacteria</i>	<i>Acinetobacter</i>	X86572	+	+	-
3	98	<i>Firmicutes</i>	<i>Lactobacillus</i>	EF120373	-	-	+
4	98.1	<i>Firmicutes</i>	<i>Pediococcus</i>	EF059987	-	-	+
5	80.2	<i>Proteobacteria</i>	<i>Shewanella</i>	EU075116	+	+	+
6	97	<i>Firmicutes</i>	<i>Lactobacillus</i>	HM218067	-	-	+
7	100	<i>Proteobacteria</i>	<i>Paracoccus</i>	DQ985067	+	+	+
8	82	<i>Firmicutes</i>	<i>Terribacillus</i>	FJ006860	+	+	-
9	97	<i>Actinobacteria</i>	<i>Isoptericola</i>	EU181261	+	+	-
10	96.4	<i>Actinobacteria</i>	<i>Plantibacter</i>	HE662693	-	+	-
11	97	<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	JN848336	+	+	-
12	97	<i>Actinobacteria</i>	<i>Isoptericola</i>	EU910875	+	-	-
13	99.1	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i>	AF046885	+	-	-
14	97.3	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium</i>	AJ391205	-	+	-
15	100	<i>Actinobacteria</i>	<i>Cellulosimicrobium</i>	AB188222	-	-	+

+: presencia, -: ausencia. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

A nivel de género, existen algunos ejemplos de bacterias que están presentes en las 3 dietas, como *Paracoccus* y *Shewanella*. Mientras *Acinetobacter* y *Clostridium*, están presentes en el contenido intestinal de individuos alimentados con dieta FM y con dieta SBM. En contraste con lo observado, hay géneros que se asocian exclusivamente a una dieta, por ejemplo, *Plantibacter* y *Microbacterium* solo están presentes en el contenido intestinal de individuos alimentados con dieta SBM, por otra parte, los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus* y *Cellulosimicrobium* solo están presentes en dieta FSBM.

2.- Cuantificación de bacterias totales y géneros específicos

La carga bacteriana total en los contenidos intestinales de los peces examinados, fue medida a través de microscopía epifluorescencia. La concentración de bacterias totales fue 5×10^8 , 1×10^9 y 4×10^9 bacterias/gramo de contenido intestinal en las muestras FM, SBM y FSBM, respectivamente.

En base a los resultados obtenidos de la secuenciación de bandas de TTGE y la presencia diferencial de algunos géneros identificados, se procedió a evaluar la carga de los géneros *Lactococcus*, *Shewanella*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* mediante qPCR. Como resultado se obtuvo que las bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*, están presentes en un nivel (carga) significativamente mayor en la muestras FSBM, tal como se muestra en la Figura 2. En contraste, la concentración de bacterias del género *Shewanella* es significativamente menor en las dietas SBM y FSBM respecto al control (FM); sin embargo, no se observan diferencias significativas entre las dietas SBM y FSBM.

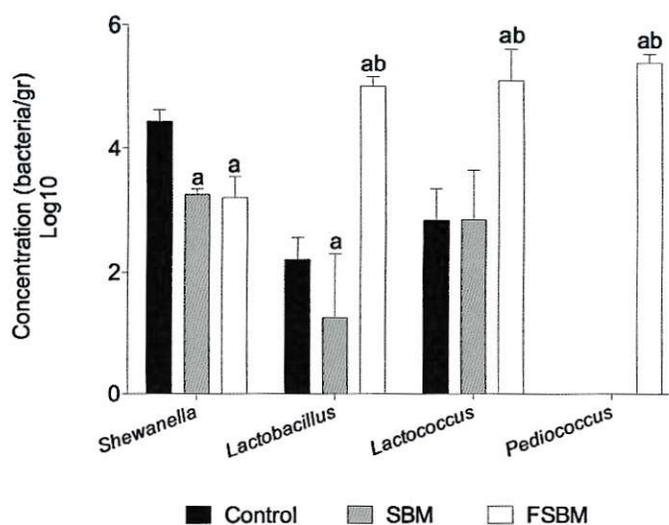


Figura 2: Cuantificación géneros bacterianos presentes en contenido intestinal de *S. salar* sometidos a la inclusión dietaria de SBM y soya FSBM. En negro se grafican los resultados de la dieta control (FM), la cual fue utilizada como parámetro para evaluar el efecto de las dietas SBM y FSBM sobre la carga de los géneros *Shewanella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Pediococcus*. Sobre las barras de desviación estándar se indican los valores estadísticamente significativos según el análisis no paramétrico t-test ($p < 0,05$), donde (a) corresponde a datos significativos respecto al control y (b) entre ambas dietas.

3.- Efecto de la inclusión dietaria de soya y soya fermentada en la expresión de genes asociados al sistema inmune en intestino y salud intestinal

Con el objetivo de caracterizar el efecto de la inclusión dietaria de SBM y FSBM sobre la inflamación en intestino proximal, se estudió la expresión relativa de tres genes involucrados en la regulación de la inmunidad intestinal en muestras de tejido intestinal

de peces. Los genes evaluados fueron los que codifican para las citoquinas proinflamatorias interleuquina 1 β (IL-1 β), interleuquina 8 (IL-8) y factor de necrosis tumoral (TNF α). Los resultados que ilustran de la influencia de las dietas SBM y FSBM sobre estos parámetros de inflamación y su variación durante el tiempo de exposición se muestran en la Figura 3, usando como referencia la condición de dieta FM.

Como resultado se obtuvo que en la dieta SBM la expresión de IL-8 e IL-1 β aumentan significativamente su expresión durante los 5 y 10 días, respectivamente, y disminuyen significativamente hacia los 20 días, llegando a valores normales al final del tratamiento. En cambio, TNF α no registra valores significativos, aunque se observa una tendencia al alza en el tiempo de manera similar a lo observado en dieta FSBM.

Por otra parte, en la dieta FSBM hubo un aumento significativo de la expresión de TNF α desde los 5 días hasta los 20 días de iniciado el tratamiento, mientras que a los 50 días la expresión de TNF α disminuye a niveles similares al control. En cuanto a la expresión de IL-8 e IL-1 β , estos aumentan significativamente a los 5 días del ensayo, sin embargo, a medida que transcurre el tiempo del experimento, tienden a volver a los niveles normales de expresión a los 50 días, del mismo modo que en SBM.

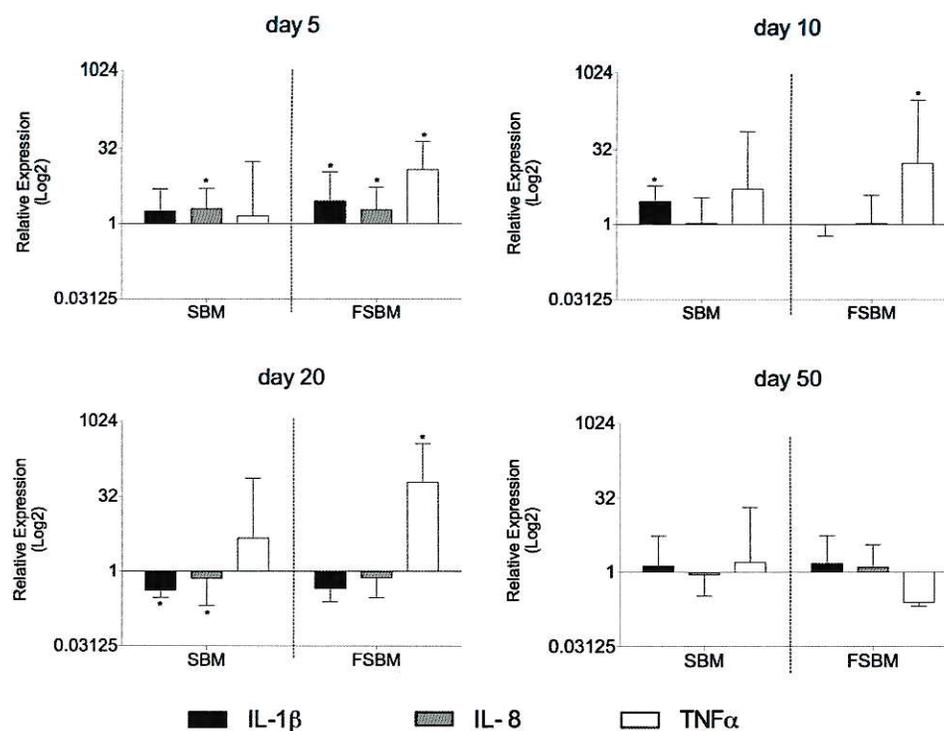


Figura 3: Expresión relativa de citoquinas IL-1 β , IL-8 y TNF α en intestino proximal de *S. salar* sometidos a la inclusión dietaria de SBM y FSBM. Las diferencias significativas se consideraron con P<0,05 y se utilizó β -actina como gen de referencia.

Con respecto a la determinación del efecto de la dieta con inclusión de soya sobre señales de absorción de nutrientes e integridad de la mucosa, los genes evaluados en muestras de tejido intestinal de peces fueron acuaporina 2ab (aqp2ab), proteína de unión a ácidos grasos 2a1 (fabp2a1), mucina 2 (muc2) y antígeno nuclear de células en proliferación (pcna). Los resultados se grafican como expresión relativa en la Figura 4.

Como resultado se obtuvo que en la dieta SBM, se observa una significativa y menor expresión relativa de los genes muc2 y fabp2a1, el día 5 del tratamiento. En contraste, en la dieta FSBM se registra aumentada significativamente la expresión de los genes fabp2a1 y aqp8ab para el mismo tiempo. El día 10 del tratamiento, se registra un aumento significativo de los genes muc2, pcna y aqp8ab en individuos alimentados con dieta SBM, por el contrario, en la dieta FSBM solo se ve un aumento en la expresión relativa de los genes muc2 y pcna. Para el día 20 del experimento, se registra una disminución de la expresión relativa de fabp2a1 en la dieta SBM, mientras que en la dieta FSBM disminuyen significativamente los genes fabp2a1 y aqp8ab. Para el día 50, no se observan diferencias significativas en la dieta SBM, sin embargo, los genes muc2, fabp2a1 y aqp8ab aumentan significativamente su expresión en tejido intestinal de peces sometidos a dieta FSBM.

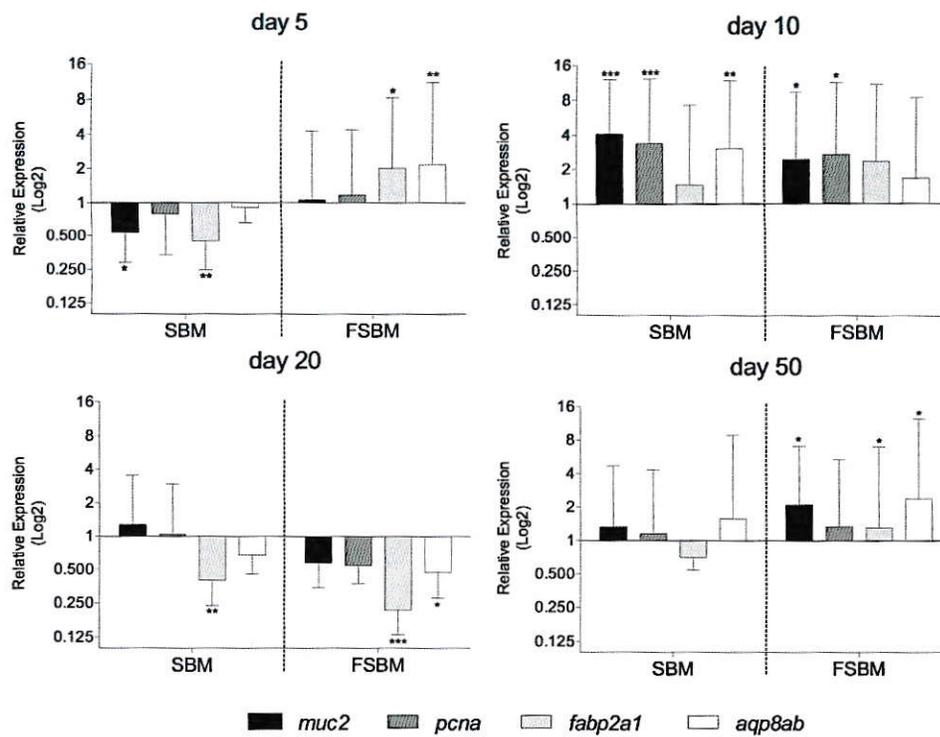


Figura 4: Expresión relativa de genes asociados a absorción de nutrientes e integridad de la mucosa intestinal de *S. salar* sometidos a la inclusión dietaria harina de soya (SBM) y harina de soya fermentada (FSBM). Mucina 2 (*muc2*), acuaporina 8ab (*aqp8ab*), antígeno nuclear de células en proliferación (*pcna*) y proteína de unión a ácido grasos 2a1 (*fabp2a1*). P<0,05 *, P<0,01 **, P<0,001 *. Usando β -actina como gen de referencia.**

DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

Actualmente se encuentra disponible gran cantidad de información respecto a la microbiota intestinal de animales, debido a los importantes roles que cumple en nutrición y defensa del hospedero. En particular, en organismos de interés acuícola se han publicado recientemente varias revisiones, porque se buscan evidencias del rol de la microbiota en peces y su posible contribución a las mejoras en la producción (Llewellyn y col., 2014; Romero y col., 2014; Nayak, 2010).

Diversos estudios referidos a la microbiota del tracto digestivo de los peces han informado que el recuento total puede variar entre 10^2 y 10^8 bacterias/gramo de contenido intestinal en salmónidos (Spanggaard y col., 2000; Pond y col., 2006; Navarrete y col., 2009). Además, algunas poblaciones microbianas pueden verse afectadas por la dieta (Spanggaard y col., 2000; Pond y col., 2006). En base a estos antecedentes en esta tesis se procedió a evaluar la carga bacteriana en peces sometidos a distintas dietas. Se observó un rango $5 \times 10^8 - 4 \times 10^9$ bacterias/gr de contenido intestinal en todas las muestras, destacándose que la carga total de bacterias no se vio afectada cuando se administraron las distintas dietas experimentales. Tomando en cuenta que para esta investigación se utilizó la metodología de cuantificación mediante microscopía de epifluorescencia, este rango coincide con lo publicado por otros autores que han realizado recuento total de bacterias presentes en el intestino, utilizando metodologías como recuento directo en el microscopio (Spanggaard y col., 2000). En general, el recuento bacteriano total en el intestino de salmónidos coincide en forma gruesa, entre los diversos estudios, a pesar de que se ha determinado por diferentes métodos. La influencia de la dieta sobre la

carga bacteriana del intestino ha sido estudiada lateralmente en algunos ejemplos. Navarrete y col., 2010 incorporaron sustancias inhibitorias (aceites esenciales) a la dieta de truchas, sin embargo, las cargas bacterianas no fueron afectadas.

Los microorganismos detectados en el contenido intestinal de *Salmo salar* correspondieron 15 géneros diferentes abarcando 3 phylum (Tabla 3). Utilizando herramientas similares, los géneros *Shewanella*, *Pseudomonas* y *Lactococcus* han sido reportados previamente en salmónidos chilenos y se han descrito como dominantes en la microbiota de dichos organismos (Romero & Navarrete 2006; Navarrete y col., 2009; Navarrete y col., 2010). Por otra parte, reportes de salmónidos cultivados en otras latitudes presentan tanto coincidencias como diferencias. Por ejemplo, Holben y col. (2002) describen la importante presencia del género *Acinetobacter*, en salmones silvestres de Escocia y Noruega. En contraste, Huber y col. (2004) reporta que la microbiota de truchas cultivadas en Dinamarca, es principalmente dominada por *Aeromonas*, *Clostridium* y *Carnobacterium*. Por otra parte, Hovda 2011 reporta que salmón del Atlántico cultivado en Noruega, presenta una microbiota dominada por bacterias ácido lácticas como *Lactococcus* y *Lactobacillus*.

En particular, se ha descrito que *Shewanella* está presente en todos los tipos de salmónidos cultivados en Chile. En este estudio las cargas de *Shewanella* se vieron afectadas por la inclusión de elementos vegetales en la dieta (SBM, FSBM), mostrando $0,5\log_{10}$ menos que en dieta FM. Este efecto no había sido informado, ya que en reportes previos con dietas SBM, se revela la presencia constante de este género en todos los grupos de peces, tanto control como tratados con dietas experimentales a niveles cercanos a 10^5 UFC/gramo de contenido intestinal (Navarrete y col., 2013). Es

probable que su presencia constante esté asociada al potencial de *Shewanella* de aportar con una diversidad de capacidades metabólicas y capacidad para proliferar a baja temperatura. Por estas propiedades, se ha propuesto utilizar bacterias del género *Shewanella* como probiótico tanto en peces como en camarones (Hau & Gralnick, 2007; Zadeh y col., 2010).

En este estudio se observó la presencia de bacterias del phylum *Firmicutes* en el contenido intestinal de peces cuya dieta incluyó soya fermentada. En particular, se detectaron los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*, que pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas (BAL). Las BAL son un grupo de bacterias Gram positivas, que utilizan los carbohidratos como fuente de energía para producir ácido láctico (Ringø & Gatesoupe, 1998). Las bacterias ácido lácticas parecen formar parte de la microbiota intestinal de peces y se ha estudiado su efecto como probióticos (Merrifield y col., 2010). Los resultados de esta investigación muestran una diferencia significativa en las cargas de estas bacterias (*Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Pediococcus*) en el contenido intestinal de peces alimentados con dieta FSBM, respecto a dieta FM y SBM. En este contexto, Heikkinen y col. (2006) estudia el efecto de la inclusión de soya (45%) en la dieta de trucha arcoíris, utilizando como control harina de pescado, observan que *Lactobacillus* está presente solo en la dieta con harina de pescado.

Entre los estudios que se refieren al efecto de la soya sobre microbiota del tracto digestivo de salmónidos se encuentran actualmente dos tendencias; por una parte, algunos autores han observado un aumento de los *Firmicutes* cuando se incluye soya en la dieta (Reveco y col., 2014), y por otro lado, aquellos que han determinado una disminución de *Firmicutes* cuando se incluye soya. Así, Desai y col., (2012) reporta que

la microbiota presente en peces alimentados con proteína vegetal (arveja, soya y canola) ya sea en su versión concentrado o harina (con aproximadamente 20% de inclusión) tenían una mayor proporción de bacterias del phylum *Firmicutes* con respecto a *Proteobacteria* y, por otra parte, concluyeron que bajo sus condiciones experimentales, el concentrado de proteínas sería menos perjudicial ya que, se reduce el impacto de la inclusión de insumos vegetales en la estructura de la microbiota, probablemente al reducir el componente carbohidratos de la dieta. En su investigación Desai y col., (2012) observaron que al incluir harina de soya en la dieta, las bacterias del phylum *Proteobacterias* son las que dominan la microbiota.

En este trabajo, se observó que la dieta FSBM favorece el desarrollo de bacterias del phylum *Firmicutes* y en especial dentro de este phylum a las bacterias ácido lácticas, que según antecedentes, benefician la salud del hospedero ya que son capaces de inhibir la adhesión a la mucosa de algunos patógenos y también tendrían la habilidad de estimular el sistema inmune (Nikoskelainen y col., 2003). Navarrete y col. (2013) estudiaron los efectos de la inclusión de bacterias ácido lácticas (*Lactococcus lactis* sp. *lactis* y *Carnobacterium maltaromaticum*) en una dieta suplementada con harina de soya en *S. salar*, y sus resultados sugieren que la presencia de bacterias ácido lácticas podría modular la inflamación intestinal, ya que es posible observar una disminución de la inflamación al día 28 del tratamiento con estas bacterias. Otra investigación sobre la utilización de *Pediococcus* como probiótico en *S. salar*, indica que al suministrar este suplemento en la dieta, la microbiota se modifica dando como resultado una mayor cantidad de bacterias del phylum *Firmicutes* en la contenido intestinal (Abid y col., 2013).

Existe una compleja interacción entre microbiota, epitelio y componentes de la mucosa, donde los microorganismos tienen un importante rol en el desarrollo y maduración del sistema inmune del intestino del hospedero. Cuando se genera un desequilibrio entre las bacterias comensales y los patógenos, se genera lo que se conoce como disbiosis. En estas circunstancias, el hospedero podría presentar enfermedades asociadas a la digestión, o generar una respuesta inmune. Por lo tanto, para complementar los análisis de microbiota, se estudió la expresión de citoquinas como interleuquina 1 β (IL-1 β), interleuquina 8 (IL-8) y factor de necrosis tumoral (TNF α), debido al importante rol que cumplen en el inicio y amplificación de la reacción inflamatoria y es un relevante blanco para modular la inflamación excesiva.

De acuerdo a Sahlmann y col. (2013) cuando se incluye SBM (20%) en la dieta de *Salmo salar* debido a la inclusión de 20% de harina de soya en la dieta, se produce una respuesta rápida de genes, que se manifiesta entre el tercer y quinto día de tratamiento, observándose cambios en la expresión de al menos 25 genes, de los cuales unos 20 son inducidos. En su estudio, los genes con mayor cambio fueron aquellos involucrados en el metabolismo de lípidos, y también fueron sobre expresados genes relacionados con la respuesta inmune. Además informan que aumenta la expresión de muchos transportadores que pueden tener un rol importante en la absorción de nutrientes. No obstante, estos autores describen efectos sobre genes relacionados con respuesta inflamatoria, tales como el receptor de quimioquina 1 (cmklr1). Esta evidencia coincide con lo reportado por Grammes y col., (2013), quienes revelaron que la inclusión de soya en la dieta afecta a otros genes del sistema inmune, como quimioquinas 20 y 28 (CCL20 y CCL28), las cuales son inducidas, mientras péptidos antimicrobianos como intelectina-1a (ITLA1), lisozima G (LYG), entre otros,

son reprimidos. En este seminario de título, se realizó un seguimiento por un período más largo que los reportes citados, es así como observamos que las señales inflamatorias IL-8 e IL-1, presentan una elevada expresión los días 5 y 10 de tratamiento con SBM. Es decir, también observamos la respuesta rápida a SBM descrita en otros estudios. Además, resulta interesante que esta respuesta disminuye (genes reprimidos) a los 20 días de tratamiento, lo cual coincide con los ciclos descritos para las señales de inflamación (Urán y col., 2009), dado que IL-8 actúa como mediador de una respuesta inflamatoria coordinada con TNF α e IL-1 y están asociados a señales tempranas de inflamación. La respuesta a dieta FSBM presentó un comportamiento similar a SBM, excepto por TNF α que se mantiene aumentado hasta el día 20 de tratamiento, lo que podría indicar una estimulación del sistema inmune que sólo vuelve a niveles comparables con el control en la medición del día 50 posttratamiento. Estas observaciones en cuanto a la señalización, coinciden con lo observado en estudios previos que reportan el efecto de dietas con SBM en salmónidos, y que incluyen un seguimiento por más de 30 días. Estos estudios indican que las manifestaciones de inflamación a nivel histológico en el intestino, se ven aumentadas hasta el día 20 posttratamiento. Estas observaciones podrían indicar una suerte de adaptación del pez a la dieta, tal como expone De Santis y col., (2015) que describe, mediante expresión génica el status del intestino de salmones sometidos 90 días a dieta con inclusión de soya, donde señales antiinflamatorias del tipo anexina 1 y un aumento de la síntesis de proteínas indican que hay reparación de tejido dañado.

Según informan Opazo y col. (2012) la fermentación de la soya usando bacterias celulolíticas, trae como beneficios la disminución de factores antinutricionales causantes de la inflamación intestinal. Por tanto, se esperaba que no se modificara la

expresión relativa, cuando hay inclusión de soya fermentada en la dieta en particular en aquellos genes asociados a digestibilidad como mucina 2 (*muc2*), acuaporina 8ab (*aqp8ab*), antígeno nuclear de proliferación celular (*pcna*) y proteína de unión a ácido grasos 2a1 (*fabp2a1*). Aun así, en esta investigación, es posible detectar que a los 20 días del experimento disminuye significativamente la expresión relativa tanto de *fabp2a1* como de *aqp8ab*, por lo que se ven afectados tanto los procesos relacionados a la absorción de lípidos, como el transporte de agua a través de las acuaporinas, lo que promueve heces con mayor contenido de agua en el salmón. Ahora bien, luego de 50 días de la inclusión de harina de soya, provoca una regulación negativa de la expresión de *fabp2a1* pudiendo interferir en la nutrición de los individuos. Por otro lado, en el mismo período, la dieta FSBM trae como beneficios el aumento en la expresión de *aqp8ab* pudiendo permitir un equilibrio hídrico en el intestino y, *muc2* que participa en la integridad de la mucosa, aportando con propiedades viscoelásticas y retención de moléculas no mucinas en el medio extracelular (Thornton y col., 2008).

Se ha visto que la saponina de soya tiene propiedades tensoactivas, lo que provoca una modificación en la permeabilidad de las membranas biológicas, generando inflamación particularmente en las células del intestino (Knudsen y col., 2008). Consecuentemente, en una investigación realizada en *Salmo salar*, donde se evalúa la inclusión de saponina de soya en la dieta (Krogdahl y col., 2015), se reporta que esta inclusión genera enteritis. Ellos reportan que la expresión de *muc2* no fue significativamente dosis dependiente, del mismo modo que *pcna* no varía su expresión relativa cuando se aumenta la dosis de saponina de soya en la dieta. Por el contrario, *fabp2a1* y *aqp8ab* son fuertemente dosis dependiente disminuyendo su expresión a medida que aumenta la inclusión de saponina de soya en la dieta de salmón. Del

mismo modo, Venold y col., (2013) reportan que la proteína de unión a ácidos grasos (fabp2a1), disminuye su expresión cuando se incluye soya en la dieta de salmón del Atlántico, en un experimento de 21 días de duración. También se ha estudiado la respuesta temprana de la expresión génica cuando se desarrolla la enteritis inducida por la inclusión de harina de soya en la dieta (Sahlmann y col., 2013). La duración del experimento en este caso fue 7 días, ellos observaron que la expresión del precursor de mucina 2 aumenta en la dieta SBM al tercer día, con respecto al control.

En resumen, a través de esta investigación fue posible identificar beneficios que tendría la dieta con inclusión de harina de soya fermentada por sobre la dieta con inclusión de harina de soya. En el contenido intestinal de peces alimentados con dieta FSBM, aumenta la carga de bacterias ácido lácticas que benefician la salud intestinal del hospedador. Y al evaluar señales de inflamación y genes asociados a la nutrición e integridad de la mucosa, es posible notar que en tejido intestinal de peces alimentados con dieta FSBM la salud del intestino del salmón se ve afectada en menor medida que con dieta SBM.

CONCLUSIONES

1. La microbiota de los salmones incluidos en este estudio, coincide con lo reportado en otros estudios y está constituida en general por bacterias de los géneros *Shewanella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Clostridium*.
2. La inclusión dietaria de soya fermentada tiene un efecto sobre la composición de la microbiota, promoviendo la aparición de bacterias del phylum *Firmicutes*, en particular, con aparición de *Pediococcus* y aumento en géneros como *Lactococcus* y *Lactobacillus*, respecto a dieta control con harina de pescado.
3. La inclusión dietaria de soya fermentada es menos perjudicial para la salud intestinal del salmón, aún así, se generan cambios a nivel de expresión de genes asociados a inflamación del tejido intestinal, en particular de las citoquinas proinflamatorias. Adicionalmente, la soya fermentada tuvo un efecto positivo sobre la expresión de genes relacionados con la absorción de nutrientes e integridad de la mucosa intestinal, en comparación con la soya no fermentada.

BIBLIOGRAFÍA

- Abid, A., Davies, S. J., Waines, P., Emery, M., Castex, M., Gioacchini, G., ... & Merrifield, D. L. (2013). Dietary synbiotic application modulates Atlantic salmon (*Salmo salar*) intestinal microbial communities and intestinal immunity. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1948-1956.
- Adeyemo, S. M., & Onilude, A. A. (2013). Enzymatic Reduction of Anti-nutritional Factors in Fermenting Soybeans by *Lactobacillus plantarum* Isolates from Fermenting Cereals. *Nigerian Food Journal*, 31(2), 84-90.
- Allen, A., Hutton, D. A., & Pearson, J. P. (1998). The MUC2 gene product: a human intestinal mucin. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 30(7), 797-801.
- Austin, B. (2006). The bacterial microflora of fish, revised. *The Scientific World Journal*, 6, 931-945.
- Bakke-McKellep, A. M., Penn, M. H., Salas, P. M., Refstie, S., Sperstad, S., Landsverk, T., ... & Krogdahl, Å. (2007). Effects of dietary soybean meal, inulin and oxytetracycline on intestinal microbiota and epithelial cell stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition*, 97(04), 699-713.
- Barnes, M. E., Brown, M. L., Rosentrater, K. A., & Sewell, J. R. (2012). An initial investigation replacing fish meal with a commercial fermented soybean meal product in the diets of juvenile rainbow trout. *Open Journal of Animal Sciences*, 2(4), 234.
- Chikwati, E. M., Venold, F. F., Penn, M. H., Rohloff, J., Refstie, S., Guttvik, A., ... & Krogdahl, Å. (2012). Interaction of soyasaponins with plant ingredients in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *British Journal of Nutrition*, 107(11), 1570-1590.
- Cole SW, Hawkley LC, Arevalo JM, Sung CY, Rose RM, Cacioppo JT. Social regulation of gene expression in human leukocytes. *Genome Biology*. 2007;8(9) R189.181-R189.113.
- De Santis, C., Bartie, K. L., Olsen, R. E., Taggart, J. B., & Tocher, D. R. (2015). Nutrigenomic profiling of transcriptional processes affected in liver and distal intestine in response to a soybean meal-induced nutritional stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 15, 1-11.
- Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R., & Beev, G. (2009). Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *International aquatic research*, 1(1), 1-29.
- Desai, A. R., Links, M. G., Collins, S. A., Mansfield, G. S., Drew, M. D., Van Kessel, A. G., & Hill, J. E. (2012). Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350, 134-142.

- Dezfuli, B. S., Giari, L., Lui, A., Squerzanti, S., Castaldelli, G., Shinn, A. P., ... & Lorenzoni, M. (2012). Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) expression in the intestine of *Salmo trutta trutta* naturally infected with an acanthocephalan. *Parasit Vectors*, 5(1), 198.
- Engelund, M. B., Chauvigné, F., Christensen, B. M., Finn, R. N., Cerdà, J., & Madsen, S. S. (2013). Differential expression and novel permeability properties of three aquaporin 8 paralogs from seawater-challenged Atlantic salmon smolts. *The Journal of experimental biology*, 216(20), 3873-3885.
- FAO, 2014. Estado mundial de la pesca y la acuicultura. Oportunidades y desafíos.
- Francis G., Makkar H. and Becker K. 2001. Antinutritional factors present in plant- derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, pp197-227.
- Friedman, M., & Brandon, D. L. (2001). Nutritional and health benefits of soy proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1069-1086.
- Fuentes-Appelgren, P., Opazo, R., Barros, L., Feijóo, C. G., Urzúa, V., & Romero, J. (2014). Effect of the dietary inclusion of soybean components on the innate immune system in zebrafish. *Zebrafish*, 11(1), 41-49.
- Gatlin DM, Barrows FT, Brown P, Dabrowski K, Gaylord TG, Hardy RW, y col. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquacult Res* 2007; 38:551–579.
- Grammes, F., Reveco, F. E., Romarheim, O. H., Landsverk, T., Mydland, L. T., & Øverland, M. (2013). *Candida utilis* and *Chlorella vulgaris* counteract intestinal inflammation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PloS one*, 8(12), e83213.
- Green, T. J., Smullen, R., & Barnes, A. C. (2013). Dietary soybean protein concentrate-induced intestinal disorder in marine farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* is associated with alterations in gut microbiota. *Veterinary microbiology*, 166(1), 286-292.
- Hau, H. H., & Gralnick, J. A. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, 237-258.
- Hedrera, M. I., Galdames, J. A., Jimenez-Reyes, M. F., Reyes, A. E., Avendaño-Herrera, R., Romero, J., & Feijóo, C. G. (2013). Soybean meal induces intestinal inflammation in zebrafish larvae. *PloS one*, 8(7), e69983.
- Heikkinen, J., Vielma, J., Kemiläinen, O., Tirola, M., Eskelinen, P., Kiuru, T., ... & von Wright, A. (2006). Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 261(1), 259-268.

- Hill, G. T., Mitkowski, N. A., Aldrich-Wolfe, L., Emele, L. R., Jurkonie, D. D., Ficke, A., ... & Nelson, E. B. (2000). Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied soil ecology*, 15(1), 25-36.
- Holben, W. E., Williams, P., Saarinen, M., Särkilahti, L. K., & Apajalahti, J. H. A. (2002). Phylogenetic analysis of intestinal microflora indicates a novel *Mycoplasma* phylotype in farmed and wild salmon. *Microbial Ecology*, 44(2), 175-185.
- Hovda, M. B., Lunestad, B. T., Fontanillas, R., & Rosnes, J. T. (2007). Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 272(1), 581-588.
- Huber, I., Spanggaard, B., Appel, K. F., Rossen, L., Nielsen, T., & Gram, L. (2004). Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 96(1), 117-132.
- Izvekova, G. I., Izvekov, E. I., & Plotnikov, A. O. (2007). Symbiotic microflora in fishes of different ecological groups. *Biology Bulletin*, 34(6), 610-618.
- Johnson, I. T., Gee, J. M., Price, K., Curl, C., & Fenwick, G. R. (1986). Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport in vitro. *The Journal of nutrition*, 116(11), 2270-2277.
- Kaitetzidou, E., Chatzifotis, S., Antonopoulou, E., & Sarropoulou, E. (2015). Identification, Phylogeny, and Function of fabp2 Paralogs in Two Non-Model Teleost Fish Species. *Marine Biotechnology*, 17(5), 663-677.
- Kelman, Z. (1997). PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, 14(6), 629-640.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1), 1-14.
- Knudsen D., Uran P., Arnous A., Koppe W. and Frøkiaer H. 2007. Saponin-Containing Subfractions of Soybean Molasses Induce Enteritis in the Distal Intestine of Atlantic Salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, pp: 2261-2267.
- Knudsen, D., Jutfelt, F., Sundh, H., Sundell, K., Koppe, W., & Frøkiær, H. (2008). Dietary soya saponins increase gut permeability and play a key role in the onset of soyabean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition*, 100(01), 120-129.
- Krogdahl, Å., Gajardo, K., Kortner, T. M., Penn, M., Gu, M., Berge, G. M., & Bakke, A. M. (2015). Soya saponins induce enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(15), 3887-3902.

- 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(June), 207.
- Magne, F., Abély, M., Boyer, F., Morville, P., Pochart, P., & Suau, A. (2006). Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS microbiology ecology*, 57(1), 128-13.
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T., Børgwald, J., & Ringø, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1), 1-18.
- Merrifield, D. L., Ringø, E., Myklebust, R., & Olsen, R. E. (2011). Dietary effect of soybean (*Glycine max*) products on gut histology and microbiota of fish. INTECH Open Access Publisher.
- Muyzer, G., & Ramsing, N. B. (1995). Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Water Science and Technology*, 32(8), 1-9.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 695-700.
- Navarrete, P., Espejo, R. T., & Romero, J. (2009). Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Microbial ecology*, 57(3), 550-561.
- Navarrete, P., Fuentes, P., la Fuente, L., Barros, L., Magne, F., Opazo, R., ... & Romero, J. (2013). Short-term effects of dietary soybean meal and lactic acid bacteria on the intestinal morphology and microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Nutrition*, 19(5), 827-836.
- Navarrete, P., Magne, F., Mardones, P., Riveros, M., Opazo, R., Suau, A., & Romero, J. (2010). Molecular analysis of intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS microbiology ecology*, 71(1), 148-156.
- Navarrete, P., Toledo, I., Mardones, P., Opazo, R., Espejo, R., & Romero, J. (2010). Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. *Aquaculture Research*, 41(10), e667-e678.
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41(11), 1553-1573.
- Naylor, R.L., Goldberg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017-1024

- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S., Lilius, E.M., 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol.* 15, 443–452.
- Nordrum, S., Bakke-McKellep, A.M., Krogdahl, A., Buddington, R. K., 2000. Effects of soybean meal and salinity on intestinal transport of nutrients in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol., B* 125, 317–335
- Opazo, R., Ortuzar, F., Navarrete, P., Espejo, R., & Romero, J. (2012). Reduction of soybean meal non-starch polysaccharides and α -galactosides by solid-state fermentation using cellulolytic bacteria obtained from different environments. *PLoS one*, 7(9), e44783.
- Ostaszewska, T.; Dabrowski, K.; Palacios, M.E.; Olejniczak, M.; Wieczorek, M. 2005. Growth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins. *Aquaculture* 245: 273-286
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Pond, M. J., Stone, D. M., & Alderman, D. J. (2006). Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 261(1), 194-203.
- Rawls, J. F., Samuel, B. S., & Gordon, J. I. (2004). Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), 4596-4601.
- Reveco, F. E., Øverland, M., Romarheim, O. H., & Mydland, L. T. (2014). Intestinal bacterial community structure differs between healthy and inflamed intestines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 420, 262-269.
- Ringø, E., & Birkbeck, T. H. (1999). Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture research*, 30(2), 73-93.
- Ringø, E., & Gatesoupe, F. J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160(3), 177-203.
- Ringø, E., Olsen, R. E., Mayhew, T. M., & Myklebust, R. (2003). Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture*, 227(1), 395-415.
- Ringø, E., Sperstad, S., Kraugerud, O. F., & Krogdahl, Å. (2008). Use of 16S rRNA gene sequencing analysis to characterize culturable intestinal bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with cellulose or non-starch polysaccharides from soy. *Aquaculture Research*, 39(10), 1087-1100.

- Ringø, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Refstie, S., & Krogdahl, Å. (2006). Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): the effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture*, 261(3), 829-841.
- Romero J, Espejo R (2001) The prevalence of noncultivable bacteria in oysters (*Tiostrea chilensis*, Philippi, 1845). *J Shellfish Res* 20:1235–1240
- Romero, J., & Navarrete, P. (2006). 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microbial ecology*, 51(4), 422-430.
- Romero, J., Ringø, E., & Merrifield, D. L. (2014). The Gut Microbiota of Fish. *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, 75-100.
- Sahlmann, C., Sutherland, B. J., Kortner, T. M., Koop, B. F., Krogdahl, Å., & Bakke, A. M. (2013). Early response of gene expression in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during the development of soybean meal induced enteritis. *Fish & shellfish immunology*, 34(2), 599-609.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Nielsen, T., Appel, K.F., Gram, L., 2000. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture* 182, 1–15.
- Therese, K. L., Anand, A. R., & Madhavan, H. N. (1998). Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial endophthalmitis. *British journal of ophthalmology*, 82(9), 1078-1082.
- Thornton, D. J., Rousseau, K., & McGuckin, M. A. (2008). Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu. Rev. Physiol.*, 70, 459-486.
- Urán, P. A., Gonçalves, A. A., Taverne-Thiele, J. J., Schrama, J. W., Verreth, J. A. J., & Rombout, J. H. W. M. (2008). Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & shellfish immunology*, 25(6), 751-760.
- Urán, P. A., Schrama, J. W., Rombout, J. H. W. M., Taverne-Thiele, J. J., Obach, A., Koppe, W., & Verreth, J. A. J. (2009). Time-related changes of the intestinal morphology of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at two different soybean meal inclusion levels. *Journal of fish diseases*, 32(9), 733-744.
- Venold, F. F., Penn, M. H., Thorsen, J., Gu, J., Kortner, T. M., Krogdahl, Å., & Bakke, A. M. (2013). Intestinal fatty acid binding protein (*fabp2*) in Atlantic salmon (*Salmo salar*): localization and alteration of expression during development of diet induced enteritis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 164(1), 229-240.

- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 655-671.
- Voynow, J. A., & Rubin, B. K. (2009). Mucins, mucus, and sputum. *CHEST Journal*, 135(2), 505-512.
- Zadeh, S.S., Saad, C.R., Christianus, A., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Shamsudin, M.N. & Neela, V.K. (2010) Assessment of growth condition for a candidate probiotic, *Shewanella* algae, isolated from digestive system of a healthy juvenile *Penaeus mon-odon*. *Aquacult. Int.*, 18, 1017–1026
- Zhang, J. X., Guo, L. Y., Feng, L., Jiang, W. D., Kuang, S. Y., Liu, Y., ... & Zhou, X. Q. (2013). Soybean β -conglycinin induces inflammation and oxidation and causes dysfunction of intestinal digestion and absorption in fish. *PLoS one*, 8(3), e58115.