



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Estudio de la microbiota intestinal de dorada (*Sparus aurata*)
alimentada con diferentes dietas basadas en insectos

ALUMNA: María Dolores Espinosa Pérez

DIRECTORES: María del Carmen Vargas García
Fernando García Barroso

Almería, junio 2021



Agradecimientos

Quiero agradecer muy especialmente a Carmen su inestimable guía, dedicación y generosidad. Una magnífica profesora y un honor haber sido su alumna.

Gracias a Fernando por hacerme participe de su estupendo trabajo.

*Dedicado a mis compañeros de batallas durante este Máster, Alex, Lidia y Javi.
Feliz por la amistad forjada. Fuerza y ánimo. Seguimos.*





ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
1.1. RESUMEN.....	3
1.2. ABSTRACT.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1. IMPORTANCIA DE LA ACUICULTURA.....	4
2.1.1. La producción de alimentos.....	4
2.1.2. Acuicultura.....	4
2.1.3. Dorada: descripción y cultivo.....	6
2.2. ALIMENTACIÓN ACUÍCOLA.....	8
2.2.1. Fuente de proteínas en alimentación acuícola.....	8
2.2.2. Uso de insectos en alimentación acuícola.....	9
2.2.3. Mosca soldado negra (<i>Hermetia illucens</i>).....	10
2.2.4. Gusano de la harina (<i>Tenebrio molitor</i>).....	11
2.3. MICROBIOTA INTESTINAL.....	12
2.3.1. Microbiota intestinal de peces.....	12
2.3.2. Efectos de alimentación con insectos en la microbiota de los peces.....	13
2.4. METAGENÓMICA.....	14
2.4.1. Aplicaciones de la metagenómica en acuicultura.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	16
4.1.1. Dietas administradas.....	16
4.1.2. Ensayo de alimentación de los peces.....	17
4.1.3. Muestras analizadas.....	18
4.2. ANÁLISIS METAGENÓMICO.....	18
4.3. ÍNDICES DE BIODIVERSIDAD.....	19
4.3.1. Índice de Shannon-Wiener (H').....	19
4.3.2. Índice de Simpson (D).....	19



4.3.3. Índice de Sorensen-Dice cualitativo y cuantitativo.....	20
4.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO	20
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
5.1. ÍNDICES DE BIODIVERSIDAD	22
5.1.1. Índices absolutos.....	22
5.1.2. Índices reducidos (Abundancias relativas >0,5 %).....	24
5.2. COMPOSICIÓN DEL MICROBIOMA GASTROINTESTINAL.....	26
5.2.1. Afiliaciones taxonómicas.....	26
5.2.2. Mapa de calor: OTUs dominantes.....	33
6. CONCLUSIONES.....	38
7. BIBLIOGRAFÍA.....	39



1. RESUMEN

1.1. RESUMEN

En los últimos años la industria acuícola ha incorporado ciertos insectos como fuente de proteínas en sus piensos al objeto de disminuir su dependencia de las harinas de pescado. Los estudios realizados al respecto se han centrado en el efecto sobre el crecimiento de los peces, pero no ha sido bien analizado su efecto sobre la composición de su microbiota intestinal, siendo éste un aspecto clave para la adecuación de la incorporación de insectos a la dieta acuícola. En este TFM se detalla el estudio metagenómico realizado para conocer la composición de la microbiota gastrointestinal de doradas alimentadas con distintas dietas en las que se ha sustituido parte de la harina de pescado por harina de *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor* (50 % de sustitución con cada insecto, 30 % con *Hermetia*, 50 % con *Hermetia* modificada en lípidos y control con 100 % de harina de pescado). Los resultados muestran que en las dietas con insectos, más que una aparición o desaparición significativa de especies, tiene lugar una redistribución en la composición del microbioma intestinal, estando éste dominado por representantes de los géneros Vibrionales y, en menor medida, Bacillales. Además, parecen modelar más esta composición los diferentes niveles de inclusión de harina de insecto que la especie de insecto utilizada. Por otro lado, la dieta con harina de insecto rebajada en grasa disminuye el impacto sobre el microbioma, conservando un mayor grado de homología con la dieta control.

Palabras clave: Acuicultura, *Sparus aurata*, microbiota intestinal, harina de insecto, *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor*.

1.2. ABSTRACT

In recent years the aquaculture industry has incorporated several insect species as a source of protein in their feed to reduce their dependence on fishmeal. The studies carried out in this regard have focused on the effect on fish growth, but their effect on the composition of their gut microbiota has not been well analyzed, this being a key aspect for the suitability of the incorporating insects into aquaculture diets. This TFM details the metagenomic study carried out to know the composition of the gastrointestinal microbiota of sea breams fed with different diets in which fishmeal has been partially replaced by *Hermetia illucens* and *Tenebrio molitor* meal (50 % substitution with each insect, 30 % with *Hermetia*, 50 % with defatted *Hermetia* and control with 100 % fishmeal). The results show that in the insect diets, rather than a significant appearance or disappearance of species, there is a redistribution in the composition of gut microbiome, which is dominated by representatives of the Vibrionales and, to a lesser extent, Bacillales orders. Furthermore, the different levels of insect meal inclusion seem to shape this composition more than the specie of insect used. On the other hand, the diet with low-fat insect meal decreases the impact on the microbiome, retaining a higher degree of homology with the control diet.

Key words: Aquaculture, *Sparus aurata*, gut microbiota, insect meal, *Hermetia illucens* and *Tenebrio molitor*.



2. INTRODUCCIÓN

2.1. IMPORTANCIA DE LA ACUICULTURA

2.1.1. La producción de alimentos

El crecimiento de la población y del consumo propicia el aumento de la demanda mundial de alimentos. La competencia por la tierra, el agua y la energía está al alza, además de la sobreexplotación de los recursos naturales, lo que afecta a la capacidad productiva. Por otro lado, es necesario reducir el impacto del sistema alimentario en el medio ambiente, a la vez que hay que considerar los efectos del cambio climático. El uso de vías innovadoras puede permitir que se produzcan más y mejores alimentos y puede garantizar que se utilicen de manera más eficiente y equitativa (Godfray *et al.*, 2010).

Si bien los océanos producen el 50 % de la biomasa del planeta, los alimentos procedentes de ellos solo alcanzan el 2 % del consumo diario de calorías por persona y el 15 % del consumo de proteínas mundial (Comisión Europea, 2017). Los alimentos de origen acuático aportan ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Omega-3: Ácido docosahexaenoico, DHA, y EPA, Ácido eicoesapentaenoico) y aminoácidos esenciales, sus proteínas tienen mayor biodisponibilidad que las vegetales y son fuente de vitaminas (D, A y B) y minerales (calcio, iodo, zinc, hierro y selenio). Además, los recursos para producirlos son menores que los de origen en tierra, ya que las tasas de reproducción de los animales acuáticos son muy superiores a las de los terrestres, aparte de ser más eficientes en la conversión de su alimento. Así pues, si se aumenta la proporción de alimentos procedentes de los océanos se reducirá la presión de la agricultura sobre los recursos naturales terrestres (APROMAR, 2020).

2.1.2. Acuicultura

La acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos que implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción (FAO, 2019). Surgió hace 4.000 años, aunque hasta hace apenas 50 no se ha convertido en una actividad socioeconómica relevante. Abarca prácticas variadas y un gran número de especies y sistemas de producción. En las granjas acuícolas se crían peces, crustáceos, algas, moluscos y otros invertebrados. Además del papel clave en el suministro de alimento, otras finalidades de esta actividad son la elaboración de productos farmacéuticos, la suelta de ejemplares para la pesca deportiva, la repoblación del medio natural, la acuariofilia o la investigación científica (APROMAR, 2020).



En la Figura 1 puede observarse cómo ha aumentado la producción acuícola a un ritmo de 7,5% por año desde 1970. A pesar de este rápido crecimiento, su margen de mejora es amplio. Esto supone que el sector deberá afrontar grandes desafíos ambientales a medida que intensifica la producción, lo que exige nuevas estrategias de desarrollo para una acuicultura sostenible. Esas estrategias deben aprovechar los avances técnicos logrados en aspectos como los piensos, la selección genética, la bioseguridad o el control de enfermedades (FAO, 2020).

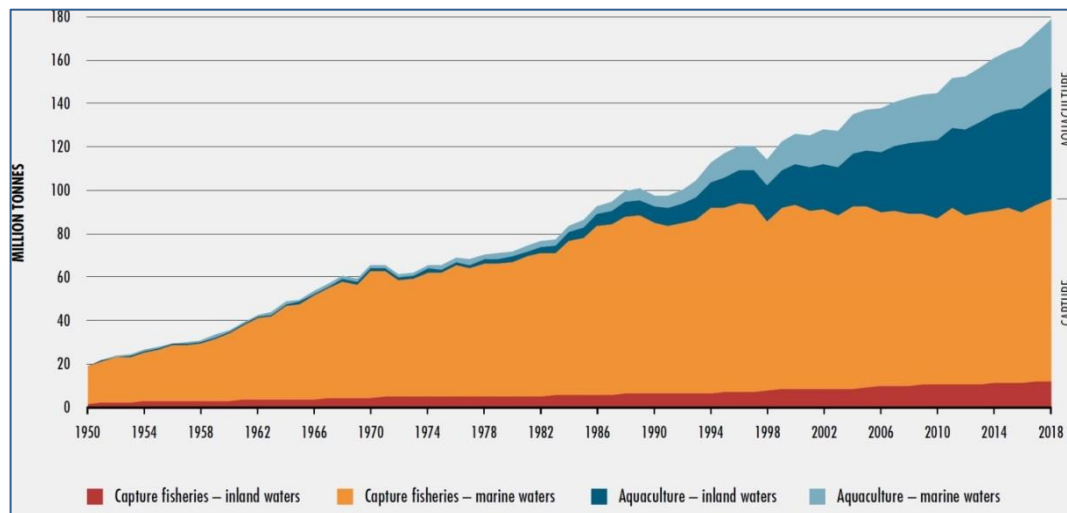


Figura 1. Evolución de la producción acuática mundial (pesca + acuicultura) en el periodo 1950-2018 (FAO, 2020).

La gran biodiversidad del medio acuático y la adaptabilidad de las especies a unos cada vez mejores sistemas de producción permitieron que en 2018 se produjeran en el mundo 466 especies acuícolas diferentes, 305 de ellas en cantidades superiores a 100 toneladas anuales (47,4 % peces, 15,3 % moluscos, 8,2 % crustáceos y 28,3 % algas). Esto supuso la producción de en torno a 82 millones de toneladas, valoradas en 250 billones de dólares, frente a las 97 millones de toneladas y 151 billones de dólares de la pesca convencional. Del total de la producción, el 87 % fue destinado al consumo humano, lo que equivale a un consumo per cápita de 20,5 kg (FAO, 2020).

País	Cantidad (t)	Valor (M€)
China	64.358.481	123.599
Indonesia	15.896.100	10.716
India	6.182.000	10.543
Vietnam	3.831.241	11.573
España	311.032	479
Total Mundial	111.946.623	210.909

Tabla 1. Principales países productores de acuicultura en 2018 (FAO, 2020).

En 2018 la mayor parte de la producción mundial de acuicultura tuvo lugar en Asia, con China como país destacado (Tabla 1). La Unión Europea es el principal mercado mundial de productos acuáticos, pero sólo pudo suplir una cuarta parte de su demanda interna mediante autoabastecimiento. España fue el primer productor dentro de la Unión Europea en cantidad y el cuarto si se considera el valor de venta (APROMAR, 2020).

La principal especie cultivada en España durante 2018 fue el mejillón, con 273.600 t producidas. En cuanto a las especies de peces, en la Tabla 2 se enumeran las principales producidas en el mismo periodo en el mundo, Unión Europea y España.
















MUNDO			UNIÓN EUROPEA			ESPAÑA		
Carpa china		5.519	Salmón atlántico		209	Lubina		21
Carpa plateada		4.704	Trucha arcoiris		185	Trucha arcoiris		18
Tilapia del Nilo		4.130	Dorada		95	Dorada		14
Carpa común		4.129	Lubina		79	Rodaballo		8,5
Carpa cabezona		2.899	Carpa común		74	Atún rojo		1

Tabla 2. Principales especies de peces cultivados en 2018 en miles de toneladas (OESA, 2020).

En nuestro país existen más de 5.000 establecimientos de acuicultura marina y continental. A pesar de su buena salud actual, son numerosos los retos que la acuicultura española tendrá que enfrentar los próximos años, como la competencia por el espacio en la zona marítimo-terrestre, la carga administrativa que supone la puesta en marcha de nuevas autorizaciones para actividades acuícolas, la correcta gestión ambiental (domesticación, alimentación, sanidad animal, tratamiento de residuos y efectos sobre fauna y flora), la mejora de la comercialización y la apuesta por I+D+i (OESA, 2020).

2.1.3. Dorada: descripción y cultivo

La dorada (*Sparus aurata*) pertenece a la clase Actinopterygii, orden Perciformes y familia Sparidae. El cuerpo es alto, ovalado y aplanado (Figura 2). Mide unos 35 cm de longitud, pudiendo alcanzar los 70 cm. Tiene 11 radios espinosos dorsales, 13-14 radios blandos dorsales, 3 radios espinosos anales y 11-12 radios blandos anales. Presenta una gran mancha negra en la cubierta branquial y una característica franja dorada entre los ojos (Muus *et al.*, 1999).

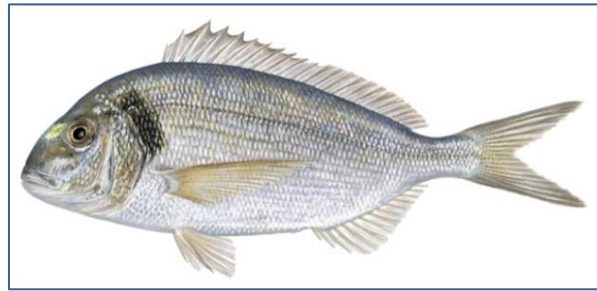


Figura 2. Ejemplar de dorada. (Scandinavian Fishing Year Book; https://mare.istc.cnr.it/fisheriesv2/species_es?sn=34269).

Se considera un pez de aguas salobres o marinas que puede habitar a una profundidad de 1 a 150 m, aunque lo habitual es encontrarlo a no más de 30 m (Lloris, 2005). Se distribuye por el litoral Atlántico Este, desde Gran Bretaña hasta Cabo Verde e islas Canarias, y por toda la costa mediterránea, y se cataloga como especie de hábitos sedentarios, ya sea solitario o en pequeñas agregaciones. En primavera aparece en lagunas y estuarios costeros de aguas salobres. Es principalmente carnívoro y accesoriamente herbívoro (Bauchot, 1990).

Es una especie hermafrodita protándrica que primero crece como macho y a partir del tercer año de vida como hembra. El desove ocurre de octubre a diciembre, con periodos de incubación de unos 2 días y etapas larvales de 43 a 50 días (De Mitcheson y Liu, 2008).

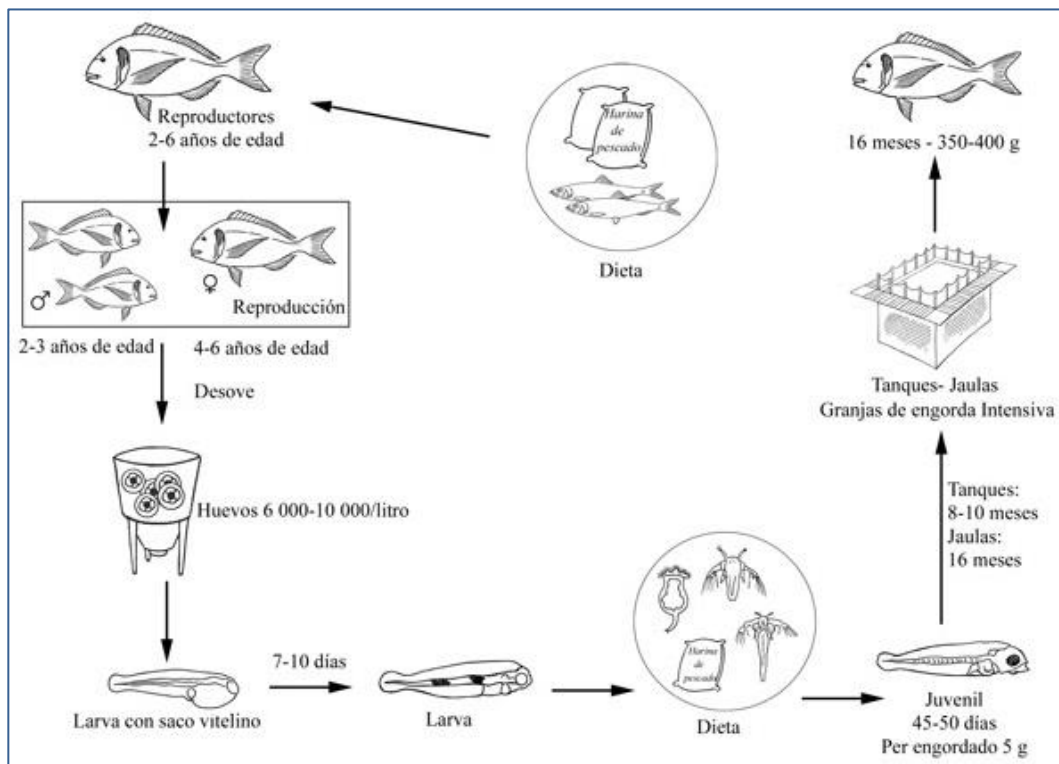


Figura 3. Ciclo de producción de dorada en sistema intensivo (Colloca y Cerasi, 2005).



Se cultiva en casi todos los países mediterráneos. Los centros de reproducción producen huevos a partir de ejemplares seleccionados en condiciones controladas. Durante el primer mes de cultivo, las larvas se alimentan de rotíferos y artemia, y más tarde inician la alimentación con pienso. Para la crianza se usan viveros flotantes en el mar, tanques de hormigón o estanques en tierra. Cada dorada tarda de 18 a 24 meses en alcanzar los 400 g, abarcando la talla comercial desde los 250 g hasta más de 2.000 g (APROMAR, 2020). La Figura 3 muestra un esquema del ciclo de producción.

2.2. ALIMENTACIÓN ACUÍCOLA

La harina y el aceite de pescado son la fuente óptima de alimento en acuicultura, ya que son fácilmente digeribles y proporcionan un equilibrio casi perfecto de nutrientes esenciales, lo que permite conseguir una buena salud y bajos índices de conversión alimenticia (Naylor *et al.*, 2009). Para lograr la sostenibilidad, tanto del sector pesquero como del acuícola, uno de los retos a los que se enfrenta la acuicultura actual es la transición del uso de alimento de origen marino a sustitutos de origen terrestre (Lazzarotto *et al.*, 2015). El aumento de la demanda de productos acuáticos y el agotamiento progresivo de los caladeros (Tacon y Metian, 2008) han propiciado que en los últimos años haya disminuido el uso de estos recursos en la elaboración de piensos. La introducción de moluscos, morralla y subproductos pesqueros y acuícolas no puede cubrir la demanda del sector. En las últimas décadas, instituciones e industria han realizado numerosos estudios con el objeto de reducir la dependencia de la harina de pescado, logrando implementar en mayor o menor medida fuentes de carbohidratos, aceites y proteínas de animales y plantas terrestres para piensos acuícolas, tales como harinas de subproductos de aves de corral, cereales, oleaginosas o legumbres, e incluso otros ingredientes como algas, hongos o bacterias (FAO, 2012).

2.2.1. Fuente de proteínas en alimentación acuícola

Las proteínas suponen el 40-45 % de los componentes de la dieta de peces cultivados de naturaleza carnívora (Rimoldi *et al.*, 2019). Se han utilizado varias fuentes de proteínas de origen terrestre, basadas en plantas y subproductos de animales, para suplir parcialmente las de origen marino. Sin embargo, se ha comprobado que el uso de dietas libres de recursos marinos puede tener efectos negativos, como una reducción en el crecimiento y en la supervivencia de la descendencia (Lazzarotto *et al.*, 2015) y la aparición de enfermedades (Green *et al.*, 2013).

Los principales inconvenientes del uso de proteínas de origen vegetal son el bajo contenido protéico, el desequilibrado perfil de aminoácidos esenciales que contienen (en especial la deficiencia en metionina y lisina), la baja palatabilidad y la presencia de factores antinutricionales, fibra y carbohidratos no digeribles (Llagostera *et al.*, 2019). Esto causa inflamación del tracto



gastrointestinal, afectando a la absorción de nutrientes y al crecimiento del pez (Santigosa *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). Para solucionar estos problemas se ha recurrido a diversas técnicas en la elaboración del pienso como el uso de enzimas, aplicación de calor o adición de suplementos (Naylor *et al.*, 2009; Oliva-Teles *et al.*, 2015). Por otro lado, el cultivo de plantas para este fin supone un gasto en tierra, agua y energía que, en el presente contexto de demanda para consumo humano, lleva a un considerable aumento de su precio que lo limita como alternativa para la acuicultura (FAO, 2020).

En cuanto a los subproductos animales, son similares al pescado, ya que presentan un buen equilibrio de aminoácidos esenciales, contienen un alto contenido en proteínas y tienen buena digestibilidad (Bureau *et al.*, 1999; El-Haroun *et al.*, 2009). Pese a ello, no son una buena alternativa por causas técnicas y económicas. Su mayor limitación es la estricta regulación y restricciones de uso principalmente para prevenir enfermedades humanas (EU, 2013).

2.2.2. Uso de insectos en alimentación acuícola

En los últimos años la industria acuícola ha incorporado a los insectos como fuente de proteínas en sus piensos. Una reciente regulación de la Comisión Europea (2017/893, de 24 de mayo de 2017) autoriza el uso de 7 insectos (2 moscas, 2 gusanos de la harina y 3 grillos) como proteína animal procesada en acuicultura. Varias son las ventajas del uso de insectos respecto al uso de otras proteínas vegetales o animales:

- El valor nutricional de los insectos depende de factores como la especie, el estado de desarrollo del insecto, su dieta y el proceso fabril al que se sometan (Devic *et al.*, 2018; Van Huis *et al.*, 2013). En general, tienen un alto contenido en proteínas (60-80 %), lípidos (31-43 %) y fibra. Además, son ricos en aminoácidos esenciales, minerales y vitaminas (Henry *et al.*, 2015). Incluso son considerados como fuente significativa de péptidos antimicrobianos (Józefiak *et al.*, 2019a). Artrópodos como los crustáceos son parte de la dieta natural de muchos peces (Van Huis *et al.*, 2013).
- Tienen una alta eficiencia de conversión de alimento, crecen y se reproducen con facilidad y rapidez. Pueden alimentarse de desperdicios de alimentos, convirtiéndolos en biomasa rica en proteína y grasa, lo que contribuye a disminuir el daño medioambiental reutilizando residuos orgánicos (Makkar *et al.*, 2014).
- Su producción tiene un bajo impacto ecológico, ya que no necesita suelo cultivable y usa poca energía y agua. Emite bajos niveles de gases de efecto invernadero y amoníaco (Van Huis *et al.*, 2013; Oonincx *et al.*, 2010).



- Tienen bajo riesgo de transmisión de zoonosis y relativamente un bajo interés para consumo humano (Van Huis *et al.*, 2013; Henry *et al.*, 2015; Oonincx *et al.*, 2010).

No obstante, son diversos los aspectos que aún quedan por dilucidar en cuanto a su utilización en la elaboración de piensos acuícolas. Así, hay que señalar que los insectos no pueden sustituir por completo a la proteína de pescado (Huyben *et al.*, 2019), que aún no son conocidos del todo sus efectos sobre la microbiota intestinal del pez (Bruni *et al.*, 2018; Huyben *et al.*, 2019), que no tiene un perfil de ácidos grasos tan beneficioso como el del pescado y que puede haber rechazo a su uso por parte de algunos consumidores (Llagostera *et al.*, 2019).

Las dos especies que más se han estudiado son *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor*, que tienen especial interés para la acuicultura europea, en particular para la producción de lubina (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Sparus aurata*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Llagostera *et al.*, 2019).

2.2.3. Mosca soldado negra (*Hermetia illucens*)

Hermetia illucens (Linnaeus, 1758), pertenece al orden Diptera, suborden Brachycera y familia Stratiomyidae (ITIS, 2020). Presenta distribución cosmopolita en regiones comprendidas entre los 45°N y los 40°S (Diener *et al.*, 2011).



Figura 4. Mosca soldado negra (<https://ar.pinterest.com/pin/832321574855674279/>).

La mosca adulta es negra, de 15-20 mm de longitud (Hardouin *et al.*, 2003). Las larvas, de color crema, pueden alcanzar 27 mm de largo, 6 mm de ancho y pesar hasta 220 mg (Diclaro *et al.*, 2009) (Figura 4). Las larvas pueden alimentarse rápidamente de una amplia gama de materiales orgánicos (restos vegetales y animales, incluido estiércol) (van Huis *et al.*, 2013; Hardouin *et al.*, 2003). Según la disponibilidad de alimento, las larvas maduran en 2-4 meses, tras lo cual entran en fase de prepupa y después pupan durante un tiempo muy variable (Hardouin *et al.*, 2003). Los adultos no se alimentan, sino que dependen de la grasa acumulada en la etapa larval (Diclaro *et al.*, 2009).



Su cría es una forma eficiente de eliminar los desechos orgánicos, convirtiéndolos en biomasa rica en proteínas y grasas adecuada para diversos fines, como alimentación animal, biodiesel y producción de quitina (van Huis *et al.*, 2013; Diener *et al.*, 2011). Ambientalmente, no son exigentes en cuanto a las condiciones en las que pueden desarrollarse, a la vez que muestran un amplio espectro de formatos de utilización, ya que se pueden usar vivas, picadas, secas o molidas (Kroeckel *et al.*, 2012). Por otra parte, no suelen ser portadoras de enfermedades e incluso se sugiere que las larvas contienen antibióticos naturales (Newton *et al.*, 2008).

Varios experimentos han usado estas larvas como sustituto parcial o total de la harina de pescado en las dietas acuícolas, observándose un rendimiento similar o menor a causa de la influencia del tipo de sustrato de cría y el método de procesamiento (Tran *et al.*, 2015; Lock *et al.*, 2016; Renna *et al.*, 2017). A pesar de que las larvas contienen mucha proteína (de 37 a 63 % de la materia seca (MS)) y otros macro y micronutrientes importantes para los peces, también contienen bastante grasa (del 7 al 39 % MS) y cenizas (del 9 al 28 % MS). Por tanto, son necesarios más estudios sobre la composición de nutrientes y la digestibilidad, así como mejorar los métodos de procesado de las larvas. Además, el rendimiento de su cría se ve afectado por factores como la cantidad y la calidad del alimento, la temperatura, la humedad del sustrato o el apiñamiento de las larvas (Barragan-Fonseca *et al.*, 2017).

2.2.4. Gusano de la harina (*Tenebrio molitor*)

Tenebrio molitor (Linnaeus, 1758) pertenece al orden Coleoptera, suborden Polyphaga y familia Tenebrionidae (ITIS, 2020). Originario de Europa, hoy en día está distribuido por todo el mundo. Es una plaga de grano y harina (Ramos-Elorduy *et al.*, 2002).



Figura 5. Gusano de la harina (<https://viaorganica/como-criar-tenebrios-gusanos-de-la-harina-para-alimento-de-gallina/>).

Los huevos eclosionan en 10-12 días y las larvas maduran en 3-4 meses. La larva madura es amarillenta y pesa 130-160 mg, aunque tratadas en su cría con hormona juvenil resultan en gusanos



de más de 2 cm y 300 mg. Pupan en 7-9 días y el adulto es un escarabajo de no más de 2 cm que vive de 2 a 3 meses. (Finke, 2002; Hardouin *et al.*, 2003) (Figura 5).

Los gusanos de la harina son de cría sencilla, pero más cara que la de *H. illucens* (Ortiz *et al.*, 2016). Se alimentan con salvado de cereal o harina suplementado con frutas y verduras frescas, junto con fuentes de proteínas (20 % de la dieta). Se utilizan como alimento de animales suministrándolos vivos, enlatados, secos o en polvo (Hardouin *et al.*, 2003). Nutricionalmente contienen 45-60 % de proteínas, 30-45 % de grasas y menos de 5 % de cenizas en materia seca, un 60 % de agua en fresco, muy poco calcio y muy baja relación Ca:P (Klasing *et al.*, 2000).

Se ha usado harina de *T. molitor* para reemplazar la harina de pescado en distintas proporciones en alimentación de peces en diversos estudios, no encontrando grandes diferencias en cuanto al crecimiento de los animales (Gasco *et al.*, 2014; Sánchez-Muros *et al.*, 2017; laconisi *et al.*, 2018), pero desvelando propiedades como su potencial inmunoestimulante (Henry *et al.*, 2018) o cambios en la composición de la microbiota intestinal (Antonopoulou *et al.*, 2019).

2.3. MICROBIOTA INTESTINAL

El tracto gastrointestinal de los animales alberga un consorcio complejo y dinámico de microorganismos que desempeña papeles clave en el metabolismo, inmunidad y mantenimiento de la salud del anfitrión (Li *et al.*, 2014). La composición de esta microbiota depende de diversos factores como la genética, modo de vida y hábitos alimenticios del animal, y de la propia presión selectiva del hábitat intestinal (Zoetendal *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2012). En este microecosistema se establecen relaciones microorganismo-microorganismo y microorganismo-hospedador complejas y relativamente estables; cambios en estos equilibrios pueden inducir disbiosis, deteriorar la actividad de las enzimas digestivas, causar daño en tejido intestinal y aumentar la infiltración de bacterias patógenas y tóxicos lumbales (Pérez *et al.*, 2010; Chassaing *et al.*, 2015).

2.3.1. Microbiota intestinal de peces

Se ha prestado mucha atención al estudio de la microbiota intestinal de mamíferos, pero la investigación de la de peces es también importante, dado el papel fundamental del pescado en la alimentación humana. La investigación sobre los roles metabólicos de los microorganismos intestinales permite el desarrollo de estrategias eficaces en su manipulación para mejorar la salud y productividad de los peces mediante la mejora de la eficiencia del pienso, facilitando la selección de probióticos, prebióticos y químicos que mejoren la homeostasis intestinal, además de ser alternativas prometedoras a antibióticos prohibidos actualmente en alimentación animal (Li *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018).



La microbiota gastrointestinal se ve afectada por diversos factores que la hacen variar en función de sus fluctuaciones diarias. Estos factores se relacionan con el hospedador (genética, género, peso, edad, inmunidad, motilidad intestinal), el ambiente (agua, dieta, medicamentos administrados) y los propios microorganismos (capacidad de adhesión, enzimas, capacidad metabólica) (Wang *et al.*, 2018).

El tipo de dieta afecta especialmente a la estructura y composición microbiana del intestino del pez. Las bacterias presentes pueden proporcionar nutrientes esenciales y factores no nutritivos e incrementar la capacidad del hospedador para aprovechar nutrientes de los alimentos, por ejemplo, produciendo enzimas digestivas que descomponen la quitina o la celulosa (Gómez *et al.*, 2013; Ray *et al.*, 2012).

2.3.2. Efectos de alimentación con insectos en la microbiota de los peces

El principal constituyente del exoesqueleto de los artrópodos es la quitina, un polímero mucopolisacárido estructuralmente análogo a la celulosa (Goycoolea *et al.*, 2000). La quitina, por norma general, no es digerible por los peces y puede actuar como una fibra insoluble con potenciales propiedades prebióticas. También puede fermentarse parcialmente por ciertos microorganismos que puedan estar presentes en la microbiota intestinal, contribuyendo a la síntesis de vitaminas y otros metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta, la principal fuente de energía de los colonocitos (Ghanbari *et al.*, 2015). Además, se sabe que la quitina tiene actividad bacterioestática y antimicrobiana contra varias bacterias patógenas Gram negativas (Zhou *et al.*, 2013; Nawaz *et al.*, 2018). Por el contrario, esta molécula puede retener en su estructura lípidos, proteínas y otros nutrientes, haciéndolos inaccesibles a la absorción por parte del pez (Henry *et al.*, 2015).

Aparte de los potenciales efectos de la quitina, la prepupa de *Hermetia illucens* es rica en ácido láurico, un ácido graso de cadena media con propiedades antimicrobianas frente a patógenos Gram positivos (Spranghers *et al.*, 2018).

En términos generales, se puede decir que la inclusión en la dieta de *H. illucens* incrementa la cantidad y diversidad de bacterias, en particular las productoras de ácido láctico y butirato, que contribuyen a la salud del hospedador (Terova *et al.*, 2019). La propia alimentación del insecto influye en la composición de su microbiota, lo que a su vez determina en parte la composición de la del pez (Bruni *et al.*, 2018).

2.4. METAGENÓMICA

Hasta hace unos años se pensaba que la cantidad y diversidad de bacterias que habitan los peces eran muy inferiores a las de mamíferos (Ringø *et al.*, 1995). Esta idea se basaba en el uso de medios de cultivo bacterianos para establecer la presencia de microorganismos. Sin embargo, los nuevos métodos moleculares revelan que aquellos sistemas sólo mostraban menos del 0.1 % de la diversidad microbiana del tracto gastrointestinal de los peces (Romero *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014).

La metagenómica es una subdisciplina de la genómica que se usa como herramienta para analizar los genomas complejos contenidos en las comunidades microbianas (Figura 6). En lugar de tomar los microorganismos de una comunidad para cultivarlos en laboratorio, se aísla y analiza su ADN, lo que proporciona información relacionada con la diversidad microbiana presente en un lugar e incluso información sobre sus funciones y roles biológicos (Martínez-Porchas *et al.*, 2017). Su desarrollo ha sido posible gracias a avances en técnicas como el marcador taxonómico 16S del ARNr y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El gran progreso de las técnicas de secuenciación, como las plataformas 454 Roche e Illumina, han permitido en los últimos años un abaratamiento de costes y la realización de estudios más robustos (Hernández *et al.*, 2014; Garza y Dutilh, 2015). Paralelamente se han desarrollado herramientas bioinformáticas que permiten procesar la ingente cantidad de información que se obtiene y relacionarla con secuencias conocidas albergadas en bases de datos, lo que facilita la clasificación taxonómica del material analizado.

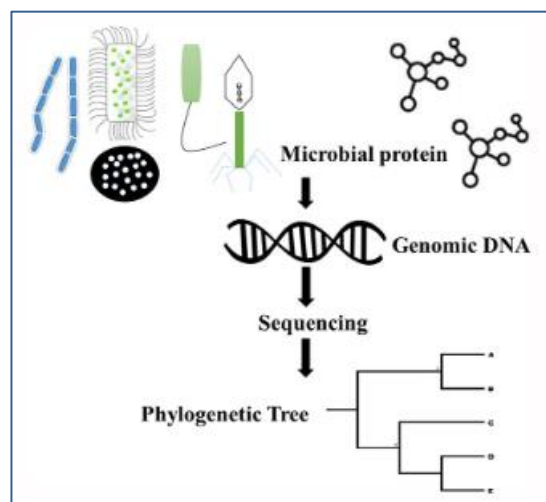


Figura 6. Metagenómica en esquema (Yukgehnaish *et al.*, 2020).

La metagenómica puede estudiar la composición de ambientes analizando un solo gen (como el que codifica la subunidad 16S del ARNr) o analizar secuencias mediante el muestreo aleatorio de muestras completas de ADN ambiental (shotgun). El segundo caso implica secuenciar todo el ADN



aislado de la muestra, lo que aún es técnicamente complicado. Sin embargo, se espera una cobertura completa con el desarrollo de la tecnología de secuenciación de tercera generación, que se pretende sea capaz de secuenciar una sola hebra de ADN / ARN sin amplificación (Martínez-Porchas *et al.*, 2017).

2.4.1. Aplicaciones de la metagenómica en acuicultura

De estudios metagenómicos se obtiene información sobre el efecto del microbioma intestinal en la fisiología de los peces, la composición microbiana intestinal de diferentes especies, los factores que afectan la composición microbiana intestinal y el efecto inmunológico de estos microorganismos en el huésped (Yukgehnaish *et al.*, 2020). Pero la metagenómica también es útil en la industria acuícola a otros niveles:

- Las instalaciones acuícolas son ricas en metabolitos de nitrógeno y fósforo y en materia orgánica, por lo que se le supone una gran riqueza microbiana (Martínez-Córdova *et al.*, 2009). Los estudios metagenómicos permiten conocer la diversidad completa y la función de los microorganismos no cultivables presentes en este entorno (Riesenfeld *et al.*, 2004).
- Hay estudios que analizan las interrelaciones simbióticas y antagónicas de los microorganismos con peces, crustáceos y moluscos. La metagenómica puede proporcionar datos para entender mejor estas asociaciones (Gianoulis *et al.*, 2009), así como descubrir otras que se desconocían (Quince *et al.*, 2013).
- Estudios metagenómicos funcionales o basados en secuencias permiten evaluar la resistencia a antibióticos en las comunidades bacterianas (Schmieder y Edwards, 2012).
- En los muestreos aleatorios de ADN ambiental se pueden identificar genes de resistencia a antibióticos. Se han encontrado mutaciones de multirresistencia en microorganismos presentes en industrias acuícolas; la misma comunidad microbiana puede tener mayor tolerancia a antibióticos, metales, compuestos de amoníaco y otros químicos debido a mutaciones y posterior transferencia horizontal de genes (Zhang *et al.*, 2009).
- Es útil para identificar procesos virales que ayudan a detectar especies patógenas o usarse como herramienta de detección de virus, lo que contribuye en el diagnóstico, la prevención y el desarrollo de tratamientos (Yukgehnaish *et al.*, 2020).
- Se pueden construir bibliotecas metagenómicas para biodegradación mediante la clonación de genes en bacterias y su posterior incubación en medios con compuestos tóxicos (George *et al.*, 2010).
- Ayuda a la identificación de nuevas moléculas con diferentes funciones, como enzimas u otras moléculas de interés terapéutico o industrial (Lorenz y Eck, 2005).



3. OBJETIVOS

Aunque se han realizado numerosos estudios nutricionales para establecer el efecto sobre el crecimiento de los peces de la introducción de insectos en su dieta (Henry *et al.*, 2015), hay menos información sobre el efecto que esta inclusión tiene en la composición de su microbiota intestinal (Bruni *et al.*, 2018).

El objetivo de este trabajo es realizar un estudio metagenómico que permita conocer la composición de la microbiota bacteriana gastrointestinal de doradas alimentadas con distintas dietas en las que se ha sustituido parcialmente la proteína de pescado por proteína de los insectos *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor*, así como compararlas con una dieta tradicional a base de harina de pescado. Dicho objetivo principal se desglosó en los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar y cuantificar los OTUs presentes en la microbiota intestinal de doradas alimentadas con cada una de las dietas evaluadas.
2. Establecer similitudes y diferencias entre las microbiotas determinadas.
3. Establecer las relaciones evolutivas entre los OTUs dominantes.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1.1. Dietas administradas

En este estudio se formularon un total de cinco dietas isoproteicas e isolipídicas, cuya composición específica se detalla en la Tabla 3. El carácter básico de cada una de esas dietas y su denominación fueron los siguientes:

-Control: Dieta basada en harina de pescado como única fuente de proteína.

-H-30: Dieta en la que se sustituyó el 30 % de la harina de pescado por harina de *Hermetia illucens*.

-H-50: Dieta en la que se sustituyó el 50 % de la harina de pescado por harina de *Hermetia illucens*.

-T-50: Dieta en la que se sustituyó el 50 % de la harina de pescado por harina de *Tenebrio molitor*.



-**H-50m**: Dieta en la que se sustituyó el 50 % de la harina de pescado por harina de *Hermetia illucens* modificada en cuanto a su composición lipídica. Así, con objeto de obtener una disminución en las elevadas proporciones de grasa que suelen presentar y, paralelamente, incrementar los niveles de PUFAs (ácidos grasos poliinsaturados), las larvas de *Hermetia illucens* fueron alimentadas durante sus últimos siete días con descartes de pescado.

Ingredientes (g/100 g)	Dietas				
	C	H-30	H-50	H-50m	T-50
Harina de pescado	35,9	25,3	18,0	18,0	18,0
<i>Hermetia illucens</i>	0,0	10,9	18,0	0,0	0,0
<i>Hermetia illucens</i> mejorada	0,0	0,0	0,0	18,0	0,0
<i>Tenebrio molitor</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	18,0
Gluten de trigo	10,5	13,0	15,4	15,0	11,9
Torta de soja	15,5	17,5	18,3	18,3	17,0
Harina de trigo	16,6	13,9	12,4	12,6	17,6
Lecitina de soja	1,3	1,0	0,5	0,5	0,5
Aceite de pescado	12,2	10,4	9,5	9,7	9,0
Vitaminas y minerales	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Goma guar	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Hemoglobina	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Total	100	100	100	100	100

Tabla 3. Composición de las dietas experimentales

4.1.2. Ensayo de alimentación de los peces

Los peces utilizados para este experimento fueron juveniles de *Sparus aurata* suministrados por Predomar S.L. (Carboneras, Almería). Se utilizaron en total 450 peces, que fueron pesados y distribuidos aleatoriamente en grupos de 25 animales en 15 tanques (250 L). Las dietas se ensayaron por triplicado. Durante el periodo experimental, los peces se mantuvieron en condiciones de temperatura constante (20±1 °C) y fotoperiodo natural. Los animales fueron alimentados *ad libitum* dos veces al día, a las 09:00 y a las 14:00 horas. Se registró la ingesta diaria y el ensayo de alimentación concluyó cuando los peces triplicaron el peso inicial (45 días).

Todos los procedimientos para el cuidado y manejo de la dorada se realizaron de acuerdo con la normativa específica, la Directiva del Consejo de la Unión Europea (2010/63/UE).



4.1.3. Muestras analizadas

De cada grupo de doradas se tomaron tres individuos a los que se extrajo su tracto gastrointestinal mediante presión manual para analizar su contenido microbiano independientemente.

4.2. ANÁLISIS METAGENÓMICO

La secuenciación masiva del ADN microbiano presente en el tracto gastrointestinal de los ejemplares de dorada fue realizada en los laboratorios de la empresa ADM Lifesequencing, localizada en Paterna, Valencia, España. Las muestras extraídas durante el proceso fermentativo fueron convenientemente conservadas a -18 °C, tanto en periodo de almacenamiento como durante su transporte.

La extracción del ADN se llevó a cabo según el protocolo descrito por Lyons *et al.* (2017) utilizando el kit QiAmp power fecal DNA. La concentración y calidad del ADN contenido en el extracto fueron evaluadas mediante un espectrofotómetro NanoDrop™ 3300 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.), siendo utilizados con posterioridad los extractos de características adecuadas para la construcción de las correspondientes librerías genómicas a partir de la región hipervariable V3-V4 del gen que codifica la subunidad 16S del ARNr (Klindworth *et al.*, 2013). La concentración final de las librerías se estimó mediante el protocolo PicoGreen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.). Las condiciones en las que se llevó a cabo la amplificación del ADN presente en los extractos digestivos fueron las siguientes:

-Cebadores: S-D-Bact-0341-b-s-17 (CCTACGGGNGGCWGCAG) y S-D-Bact-0785-a-A-21 (GACTACHVGGGTATCTAATCC).

-Ciclo de amplificación:

1. Desnaturalización inicial: 5 min a 95 °C.
2. Ciclos de amplificación (x25): Desnaturalización 40 s a 95 °C; Anillamiento (2 min a 55 °C); Extensión (1 min a 72 °C).
3. Extensión final: 7 min a 72 °C.

El análisis de secuenciación masiva se realizó en una plataforma Illumina MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, EE.UU.), utilizando un protocolo de extremos pareados aplicado sobre fragmentos de 300 pb. Para la resolución de las secuencias solapantes se recurrió al software PEAR v.0.9.1 (www.exelixis-lab.org/web/software/pear), mientras que para la eliminación de los adaptadores se empleó el software CUTADAPT v.1.8.1. (Martín, 2011). Aquellas secuencias con un nivel de calidad



inferior a Q20, con un tamaño por debajo de 200 pb o con presencia de secuencias quiméricas fueron eliminadas. Esta última selección se ejecutó mediante la implementación de Chimera Uchime (Edgar *et al.*, 2011). Las secuencias seleccionadas tras la aplicación de los citados criterios de exclusión fueron agrupadas en clústeres, con un nivel de corte del 97 %, utilizando el software CD-HIT v.4.6.8. (Li y Godzik, 2006; Fu *et al.*, 2012). Finalmente, fueron asignadas al máximo nivel taxonómico posible de acuerdo con los resultados generados por la herramienta de Alineamiento Local BLAST del National Center for Biotechnology Information, NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) y su base de datos asociada, GenBank.

4.3. ÍNDICES DE BIODIVERSIDAD

Una vez obtenidos los resultados de los análisis metagenómicos de todas las muestras se procesaron los datos al objeto de caracterizar la afiliación taxonómica de los OTUs (Unidades Taxonómicas Operativas) presentes y los niveles de diversidad α y β asociados a cada una de ellas:

1º) Se asignaron y ordenaron los datos obtenidos de cada muestra por categorías taxonómicas: filo, clase, orden, familia, género y especie.

2º) Se calcularon los índices de biodiversidad α (Shannon-Wiener y Simpson) y β (Sorensen-Dice).

3º) Se calcularon los mismos índices para los OTUs mayoritarios, presentes en niveles de abundancia relativa superiores al 0,5 %.

4.3.1. Índice de Shannon-Wiener (H')

Este índice estima el grado de uniformidad de una comunidad basándose en el número de especies presentes (riqueza, S) y en la cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies (abundancia) (Pla, 2006). Es una medida de equidad. Oscila entre 0 (sólo hay una especie) y logaritmo de S (todas las especies están representadas por el mismo número de individuos). Viene dado por la expresión:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

Donde:

S: riqueza específica (nº de especies diferentes en la muestra)

$p_i = n_i/N$ (abundancia relativa de la especie i)

n_i : nº individuos de la especie i

N: nº total de individuos de todas las especies



4.3.2. Índice de Simpson (D)

Expresa la probabilidad de que al extraer de una comunidad dos individuos al azar, éstos sean de la misma especie. Es una medida de dominancia donde las especies comunes tienen mucho peso respecto a las raras (Ferriol y Merle, 2012). Oscila entre 0 (comunidad totalmente homogénea) y 1 (comunidad muy heterogénea). Viene dado por la expresión:

$$D = 1 - \lambda$$

Donde:

$$\lambda = \sum p_i^2$$

4.3.3. Índice de Sorensen–Dice cualitativo y cuantitativo

Este índice compara las muestras dos a dos, relacionando el número de especies compartidas con la media de especies de ambas muestras. En términos cuantitativos, relaciona la abundancia de las especies compartidas con la abundancia total en las dos muestras (porcentaje de similitud). Oscila entre 0 (sin especies en común) y 1 (todas las especies son comunes, desde un punto de vista cualitativo, o están presentes en niveles semejantes, en términos cuantitativos). Viene dado por la expresión:

$$\frac{2c}{S_1 + S_2}$$

Donde:

c: nº de especies compartidas/sumatoria de la menor abundancia relativa de las especies compartidas

S₁: nº de especies en muestra 1/abundancia total en muestra 1

S₂: nº de especies en muestra 2/abundancia total en muestra 2

4.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Las relaciones evolutivas entre OTUs mayoritarios fueron estimadas mediante la implementación del método del Vecino Más Próximo, utilizando para ello el software Mega v.6.0. (Tamura *et al.*, 2013).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio de las poblaciones microbianas asociadas a distintos hábitats adquiere cada vez mayor importancia. Sin duda, las funcionalidades que tales comunidades aportan a dichos hábitats atraen un gran interés y son responsables, en gran medida, del auge que este tipo de estudios han

experimentado en épocas recientes. En el caso de peces, el microbioma intestinal no ha sido objeto de tanta atención como el de otro tipo de organismos, incluyendo el ser humano, de manera que su ecología microbiana presenta aún numerosas incógnitas (Nayak, 2010). En este sentido, la caracterización de las comunidades microbianas propias del tracto gastrointestinal y los potenciales cambios que pueden experimentar en función de las condiciones en las que se desarrolle la especie hospedadora, puede contribuir de forma importante al esclarecimiento de las interacciones existentes entre ambas (Ghanbari *et al.*, 2015).

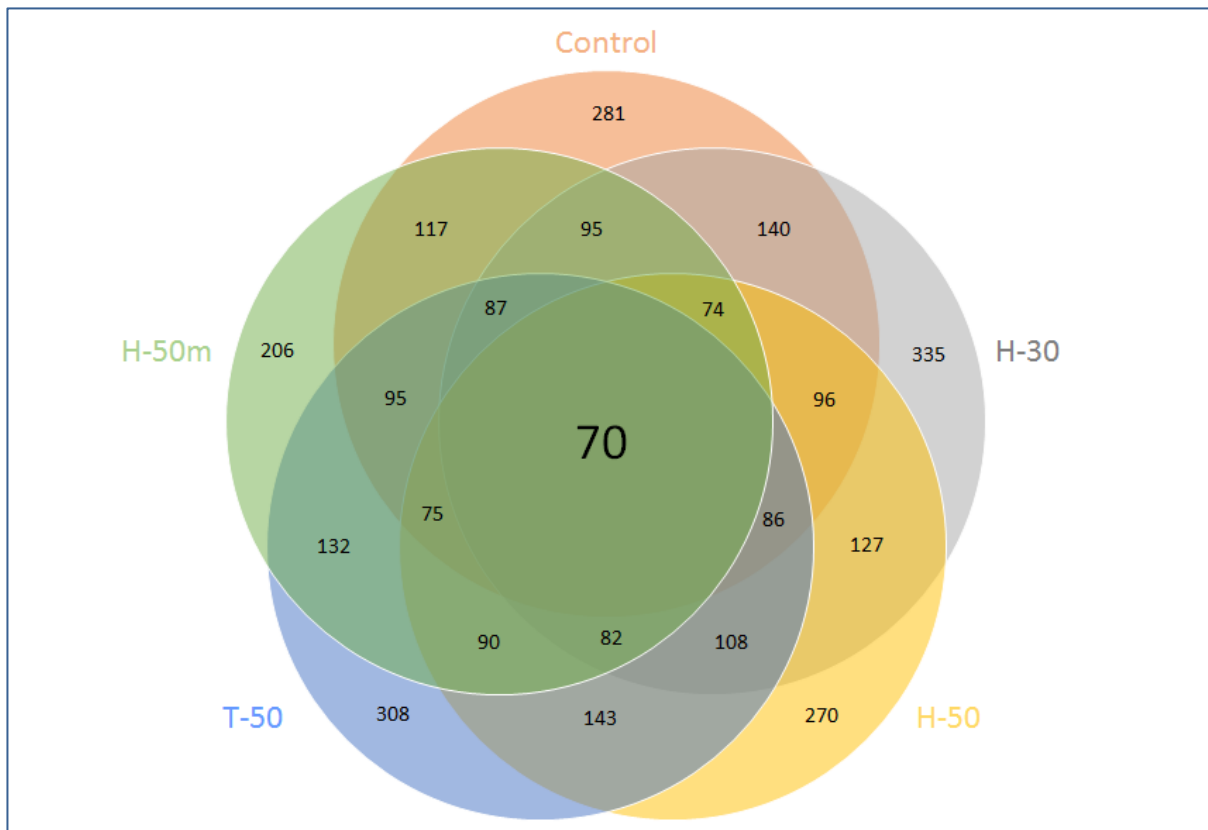


Figura 7. Diagrama de Venn representando el número de OTUs totales y compartidos entre los grupos alimentados con distintas dietas.

El análisis metagenómico permitió detectar hasta 690 OTUs diferentes en el total de las muestras. El número mayor de OTUs se detectó para el grupo H-30, mientras que el menor se asoció al H-50m (Figura 7). La cifra de OTUs presentes en todas las muestras, independientemente de la dieta que recibieron los peces, fue de 70, lo que constituiría la comúnmente denominada microbiota residente, concepto que define a aquellas especies asociadas siempre al tracto gastrointestinal y que, en consecuencia, desempeñan con gran probabilidad un papel destacado en



las interacciones existentes entre microorganismos y su hospedador (Nikouli *et al.*, 2018), en este caso, la dorada.

5.1. ÍNDICES DE BIODIVERSIDAD

5.1.1. Índices absolutos

Los datos anteriormente expuestos, números de OTUs totales y compartidos, proporcionan una imagen real de cada una de las muestras, e incluso cierta información sobre el grado de semejanza derivado de los distintos tratamientos. Sin embargo, y en relación con este último aspecto, este tipo de análisis sólo desvelan un mínimo porcentaje del potencial que encierran estos resultados.

Los índices de biodiversidad permiten, más allá de establecer la riqueza numérica de especies, conocer en qué sentido se ve afectada la microbiota de un hábitat como consecuencia de variaciones en las condiciones imperantes. Los índices de diversidad α , de carácter individualizado, proporcionan comparativas globales entre los diversos entornos analizados, mientras que los de tipo β establecen comparaciones de carácter dual. En la Tabla 4 se muestran los valores obtenidos para los índices de Shannon-Wiener y Simpson (Diversidad α) para la totalidad de la población microbiana asociada a especímenes alimentados con cada una de las dietas estudiadas.

	Control	H-30	H-50	T-50	H-50m
H'	2,59	2,16	3,10	2,39	2,85
D	0,66	0,49	0,79	0,70	0,77

Tabla 4. Índices de Shannon-Wiener (H') y Simpson (D) absolutos.

Los resultados obtenidos en ambos casos muestran que la alimentación con dietas sustituidas en un 50% con harina de *Hermetia* dio lugar a un aumento de la diversidad y la heterogeneidad en el microbioma intestinal de los peces en relación con los peces control, mientras que la sustitución en porcentajes inferiores, o con harina de *Tenebrio* generaron una disminución. Especialmente llamativo resulta el descenso en el porcentaje de heterogeneidad detectado para las muestras H-30, hecho que no se repitió en el caso de las muestras T-50 que, a pesar de mostrar niveles de diversidad inferiores al control, ofrecieron un mayor grado de heterogeneidad. Estudios recientes sobre otras especies de peces demuestran la capacidad de la harina de *Hermetia* para modular la microbiota intestinal, en la mayor parte de los casos con incrementos en los niveles de



diversidad (Bruni *et al.*, 2018; Terova *et al.*, 2019). Por el contrario, la sustitución con harina de *Tenebrio* parece no influir tanto en los niveles poblacionales ni tampoco en la composición de las comunidades microbianas (Mikolajczak *et al.*, 2020; Terova *et al.*, 2021). Las diferencias en la respuesta microbiana intestinal a las modificaciones en la dieta pueden ser debidas a la distinta composición que presentan las harinas de ambos insectos, con porcentajes superiores de fracción fibrosa e inferiores de quitina en *Hermetia* (Marono *et al.*, 2015).

En la Tabla 5 se muestran los valores asociados a la diversidad β , expresada a través de los índices cualitativos, considerando presencialidad de especies, y cuantitativos, teniendo en cuenta los niveles de presencialidad, de Sorensen-Dice.

Ct/Ci	Control	H-30	H-50	T-50	H-50m
Control		0,4545	0,4537	0,4958	0,4805
H-30	0,2688		0,4198	0,6034	0,4917
H-50	0,5050	0,5591		0,4948	0,4202
T-50	0,5586	0,6755	0,7888		0,5136
H-50m	0,6379	0,3943	0,5890	0,6016	

Tabla 5. Índices de Sorensen-Dice cualitativo (cuadrante superior) vs. Sorensen-Dice cuantitativo (cuadrante inferior) absolutos.

El grado de semejanza en cuanto a la identidad de las especies presentes en cada tipo de muestra osciló entre el 40% y el 60%, con niveles mínimos de homología para la pareja H-30/H-50 y máximos para H-30/T-50. Este resultado parece apuntar que la composición del microbioma intestinal se ve más influenciado por el porcentaje de sustitución que por el tipo de insecto utilizado en la elaboración de la harina. Dicha hipótesis se ve también fortalecida por los valores correspondientes a los índices cuantitativos, los cuales oscilaron entre el 26% y el 79%. Así, la mayor semejanza se detectó entre H-50 y T-50, mientras que en el lado opuesto, dejando de lado el casi 27% establecido entre las muestras Control y H-30, la menor similitud se observó para la pareja H-30/H-50m. Resultados similares en cuanto a los niveles de inclusión de harina de insectos y su efecto sobre el microbioma intestinal han sido ya descritos en otros trabajos (Lu *et al.*, 2020; Mamuad *et al.*, 2021). En este sentido, y considerando una perspectiva global, un reciente estudio apunta la variabilidad existente en torno a los efectos causados por los porcentajes de sustitución



de una misma especie de insecto, así como los márgenes de aceptabilidad en función de la especie (Hua, 2021).

5.1.2. Índices reducidos (Abundancias relativas >0,5 %)

Sin duda, el análisis de la totalidad de los datos da lugar a una estimación detallada de los resultados obtenidos. Sin embargo, ese mayor grado de detalle no siempre se identifica con información más significativa. En el caso concreto de las comunidades microbianas, es obvio que no todas las especies presentes en un determinado hábitat contribuyen por igual a los eventos que en él tienen lugar. En este sentido, los niveles poblacionales pueden ayudar a diferenciar cuáles son las especies que, en mayor medida, intervienen en dichos eventos. Así, la restricción de las especies incluidas en los análisis a aquellas que sobrepasan determinados porcentajes de abundancia relativa puede ayudar a conformar una imagen más cercana a la realidad.

En las Tablas 6 y 7 se muestran los resultados obtenidos para los índices de diversidad α y β cuando las especies consideradas quedaron limitadas a aquellas con abundancia relativa superior al 0,5 % en al menos uno de los tratamientos.

	Control	H-30	H-50	T-50	H-50m
H'	2,15	1,53	2,53	2,06	2,34
D	0,63	0,42	0,76	0,68	0,74

Tabla 6. Índices de Shannon-Wiener (H') y Simpson (D) reducidos.

Ct/CI	Control	H-30	H-50	T-50	H-50m
Control		0,8947	0,8649	0,8333	0,8947
H-30	0,5632		0,9189	0,8333	0,8947
H-50	0,2726	0,6911		0,8000	0,9730
T-50	0,5169	0,8026	0,5820		0,7778
H-50m	0,6547	0,6147	0,4055	0,6117	

Tabla 7. Índice de Sorensen-Dice cualitativo (cuadrante superior) vs. Sorensen-Dice cuantitativo (cuadrante inferior) restringidos.

En términos generales, se observa como no existieron grandes diferencias en relación con los resultados asociados a los datos absolutos. Sólo en el caso de los valores obtenidos para el índice cualitativo de Sorensen-Dice se detectaron diferencias, centradas en las muestras con los mayores



valores de sustitución de harina de insectos, tanto de *Hermetia* como de *Tenebrio* (T-50 y H-50m). De forma concreta, se registró un aumento en los porcentajes de similitud en relación con las restantes muestras, con la excepción de las correspondientes a H-30. El hecho de que el incremento se de solo en el caso del índice cualitativo indica que, si bien los equilibrios poblacionales no se ven afectados por la restricción de las especies consideradas, sí lo hace la identidad de las especies compartidas. Así, la comunidad microbiana constituida por las especies dominantes en los especímenes representativos de las dietas mencionadas muestra mayor grado de homología con otros tratamientos que la comunidad global, lo que podría implicar un menor impacto de la inclusión de la harina de insectos en la fracción más influyente de la microbiota intestinal cuando el porcentaje de sustitución es superior.

Los resultados apuntados por los índices de diversidad fueron ratificados por el análisis de conglomerados (Figura 8), según el cual, las comunidades microbianas asociadas a las distintas muestras propician la creación de dos grupos de homogeneidad constituidos por las dietas Control y H-50m, en un caso, y por H-30, H-50 y T-50, en el otro. Adicionalmente, este último grupo aparece dividido en dos subgrupos, en función de la mayor similitud entre las dietas H-50 y T-50 en relación con el tercer de los tratamientos incluido en este clúster, H-30.

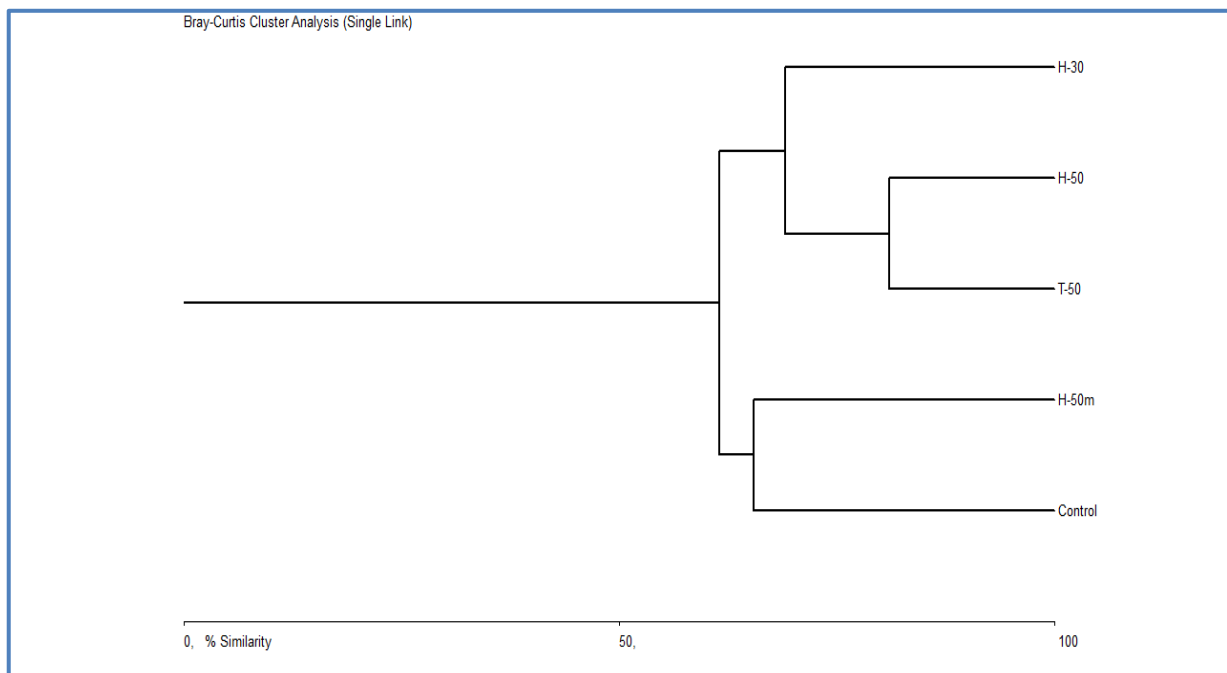


Figura 8. Dendrograma mostrando grupos de homogeneidad según el análisis de Bray-Curtis.

5.2. COMPOSICIÓN DEL MICROBIOMA GASTROINTESTINAL

A continuación se describen los resultados derivados de la asignación taxonómica de los distintos OTUs detectados y su distribución según niveles, así como el análisis de las especies dominantes. Adicionalmente, se incluyen el mapa de calor y el árbol filogenético mostrando las relaciones evolutivas entre los grupos taxonómicos dominantes (abundancia relativa superior al 0,5% en al menos una de las muestras).

5.2.1. Afiliaciones taxonómicas

En la Figura 9 se representa la composición, a nivel de filo, del microbioma gastrointestinal (abundancias relativas) detectado para los ejemplares alimentados con las distintas dietas elaboradas. A pesar de la existencia de ciertas diferencias, el perfil encontrado fue similar en todos los casos, con absoluta dominancia de las especies pertenecientes al filo Proteobacteria y, a considerable distancia, las asociadas al filo Firmicutes. Sólo otros dos filos, Bacteroidetes y Actinobacteria, mostraron representantes en todas las muestras, mientras que los siete restantes filos se pueden considerar testimoniales, con presencia en una sola de las muestras en la mayoría de los casos.

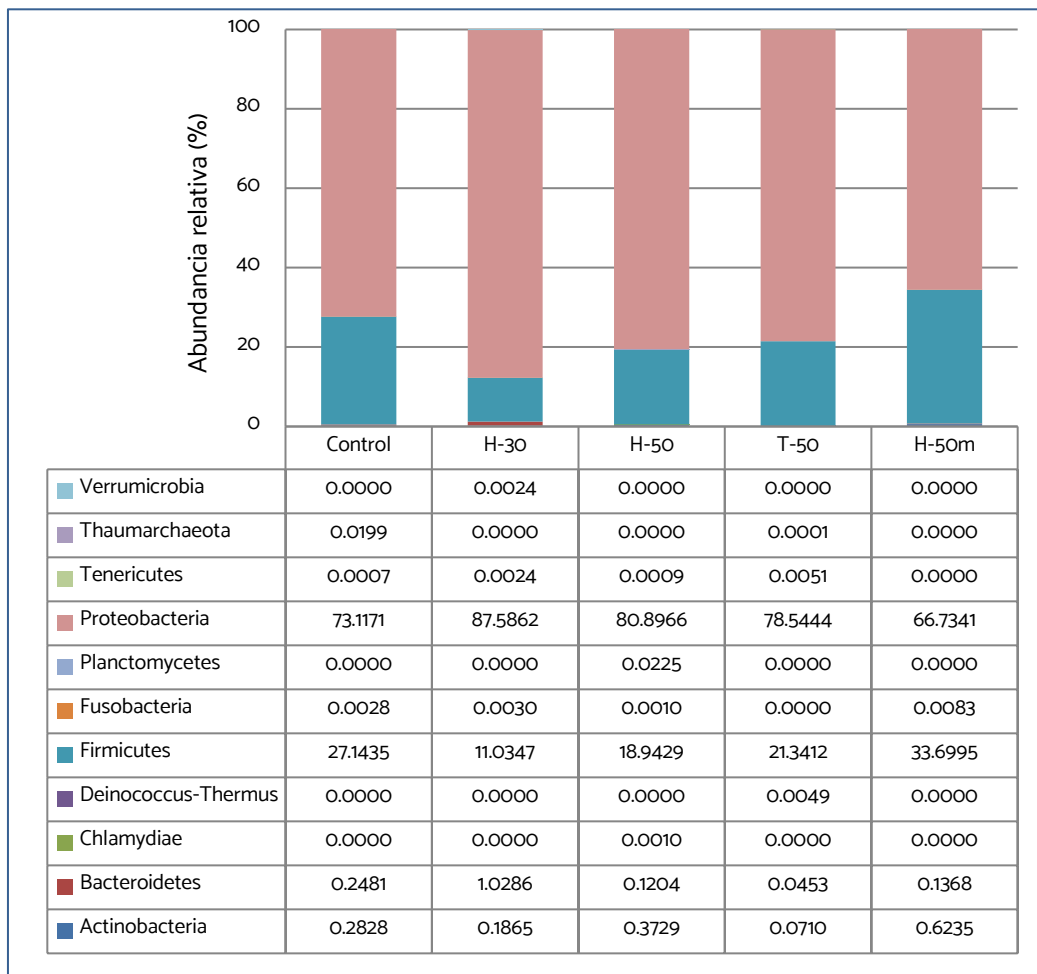


Figura 9. Composición por filos de la microbiota gastrointestinal según dieta.



Proteobacteria y Firmicutes, por ese orden, han sido descritos como grupos procariotas dominantes en el tracto gastrointestinal de la dorada (Nikouli *et al.*, 2018; Piazzon *et al.*, 2020), con influencias variables en función de las condiciones imperantes de Bacteroidetes o Actinobacteria. Otros filos, tales como Tenericutes o Fusobacteria suelen mostrar presencias mínimas (Parlapini *et al.*, 2019), aunque pueden alcanzar abundancias relativamente importantes en función de especies o condiciones concretas (Gajardo *et al.*, 2016; Givens *et al.*, 2015).

El estudio a mayores niveles taxonómicos dentro de los dos filos dominantes, Proteobacteria y Firmicutes, arrojó resultados similares en cuanto a la asignación mayoritaria de los OTUs presentes a una única clase. Así, en el caso de las proteobacterias, dicha clase fue Gammaproteobacteria. En la Figura 10 se muestran las abundancias relativas absolutas, que oscilaron entre el 66% y el 86%, pero cuando se pondera de acuerdo con los niveles de proteobacterias, dichas abundancias fueron siempre superiores al 98%, lo que prácticamente redujo la presencia de representantes de otras clases a la insignificancia.

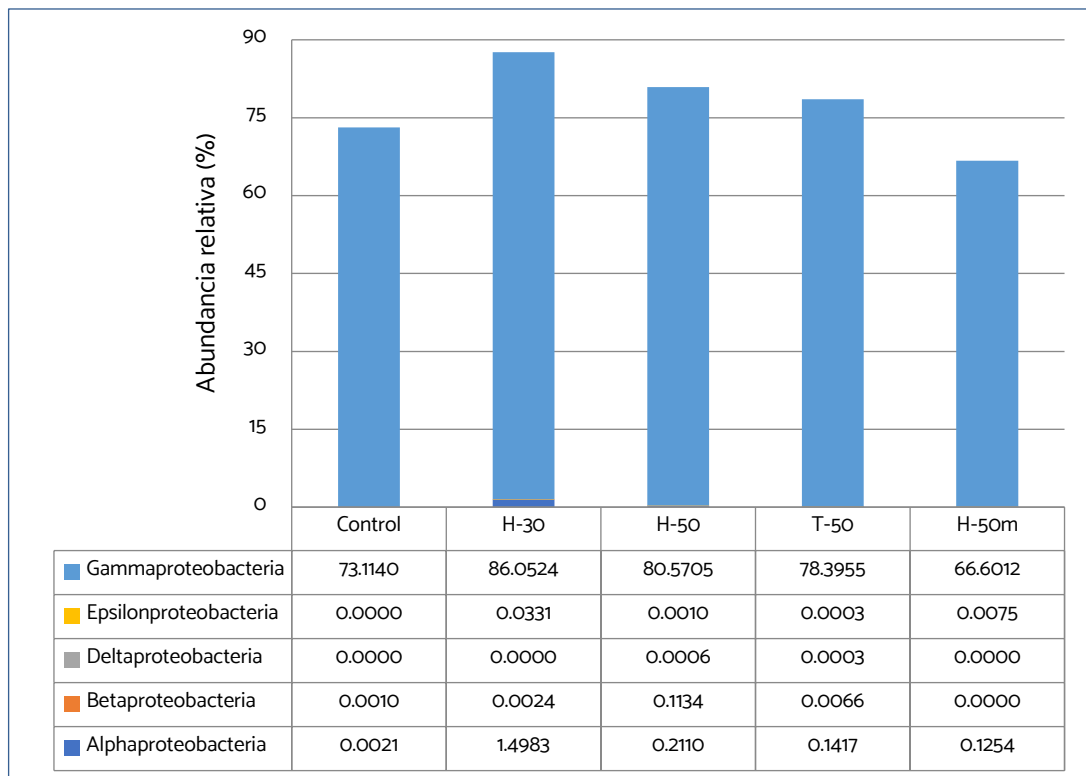


Figura 10. Distribución entre clases en el filo Proteobacteria.

Esta dominancia de las gammaproteobacterias, no sólo entre las proteobacterias, sino también en términos globales, no es algo extraño en el microbioma intestinal de los peces, hábitat en el que se ha reportado cierta tendencia a sobreestimar los niveles de especies con elevado número de copias



del gen que codifica la subunidad 16S del ARNr, como es el caso de este grupo de procariontas (Vetrovsky y Baldrian, 2013). No obstante, e independientemente de la causa, la pertenencia mayoritaria a esta clase de las proteobacterias presentes en la microbiota intestinal de los peces es algo habitual (Ward *et al.*, 2009; Larsen *et al.*, 2014; Parris *et al.*, 2016). Una de las causas contribuyentes a esta abundancia puede estar relacionada con la abundancia de este grupo microbiano en los dispositivos y materiales propios de los sistemas acuícolas (Michaud *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2020).

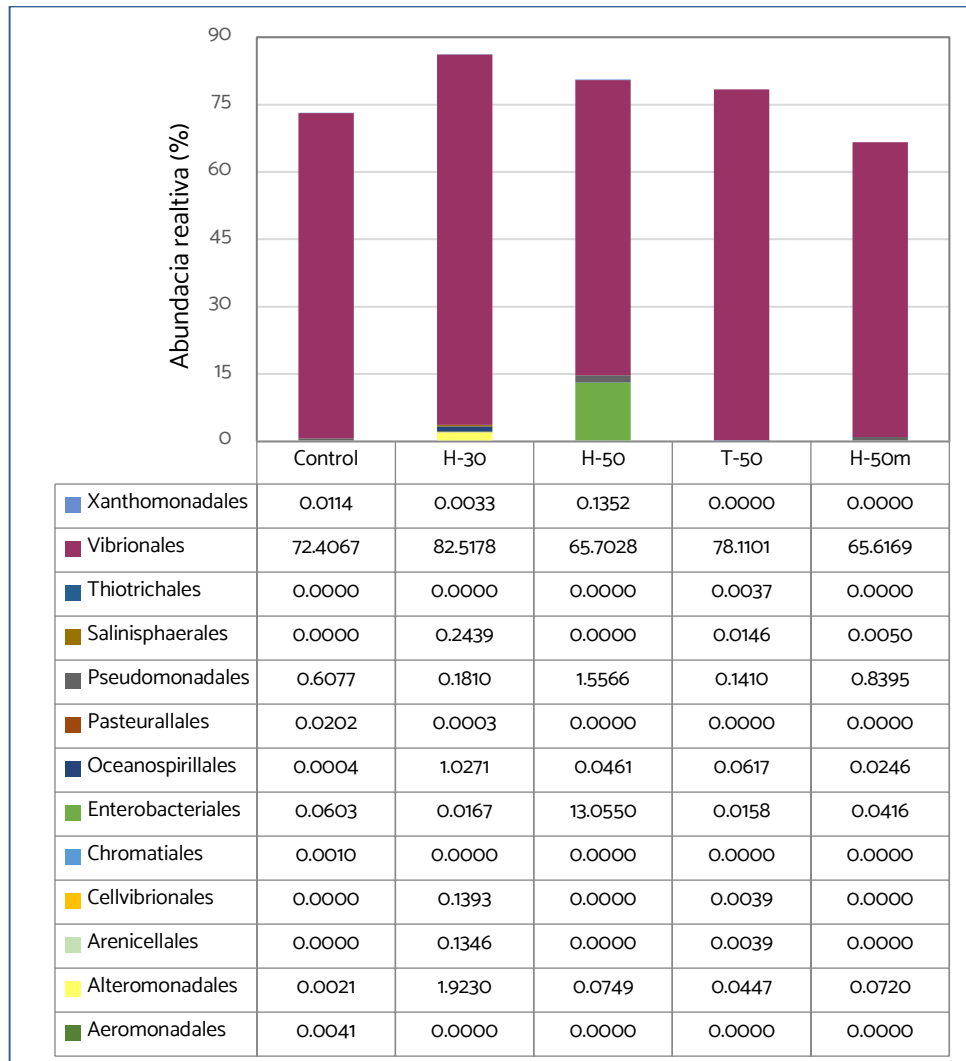


Figura 11. Distribución entre órdenes en la clase Gammaproteobacteria.

Las asignaciones a nivel de orden dentro de la clase Gammaproteobacteria siguieron el mismo patrón descrito para niveles superiores (Figura 11). Así, las especies presentes quedaron encuadradas de forma mayoritaria dentro de la clase Vibrionales, con márgenes oscilantes entre el 65% y el 82%, en cuanto a la población global, y entre el 81% y el 99%, en lo que respecta al grupo de las gammaproteobacterias. Sólo en el caso de las muestras correspondientes al tratamiento H-50 y, en

menor medida al H-30, se detectaron poblaciones representativas de otros órdenes. En el primer caso, el descenso en la abundancia de miembros de Vibrionales fue cubierto por especies asignadas a los órdenes Enterobacteriales y, menor proporción, Pseudomonadales. En el segundo caso, el escaso volumen de OTUs no identificados como integrantes del orden Vibrionales, fue distribuido entre los órdenes Alteromonadales y Oceanospirillales. Tanto Enterobacteriales como Pseudomonadales han sido frecuentemente asociadas al agua (Elshierief *et al.*, 2014; Chun *et al.*, 2018), con lo que su presencia en el tracto gastrointestinal de peces de factoría no se puede considerar como algo extraño. Menos frecuentes son, en cambio, Alteromonadales y Oceanospirillales, aunque no son especies que se puedan considerar ajenas a este tipo de ambientes, si bien su aparición está más condicionada por las condiciones específicas que se den en el sistema productivo (Xue *et al.*, 2017).

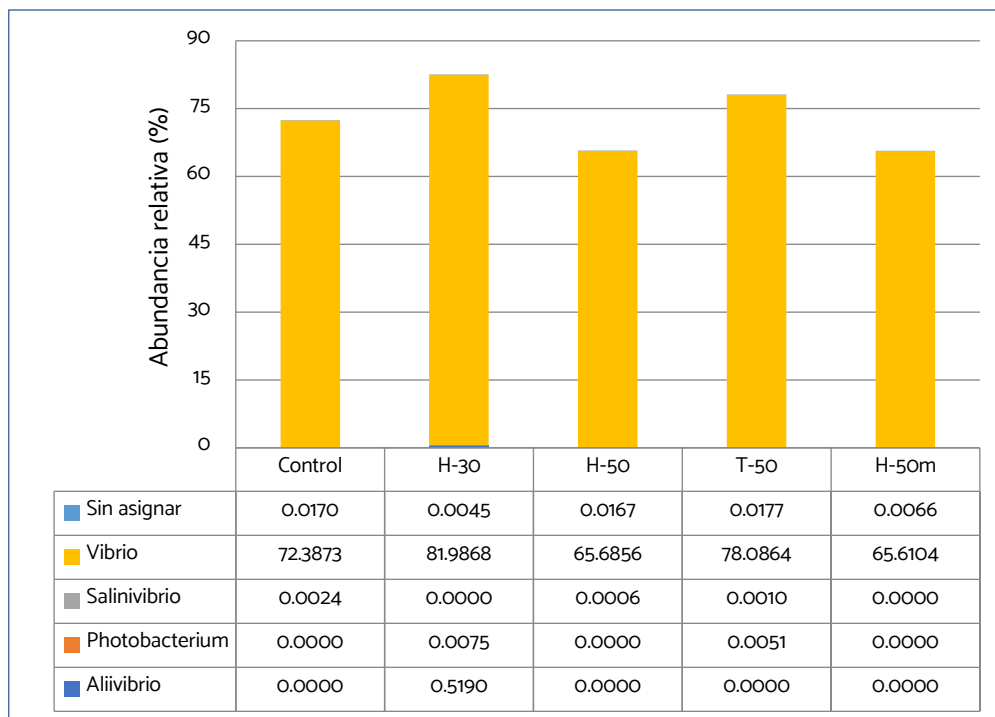


Figura 12. Distribución entre géneros en el orden Vibrionales.

El último de los niveles taxonómicos analizado fue el de género (Figura 12), dado que en relación al anterior, familia, todos los OTUs fueron asignados a un mismo grupo (Vibrionaceae). En el caso del género, se detectaron representantes pertenecientes a grupos diversos, si bien a todos ellos se les atribuyeron abundancias mínimas, salvo en el caso de *Vibrio*. Los márgenes de variación en esta ocasión oscilaron, a nivel global, entre el 65% y el 82%, mientras que, en relación al orden, supusieron prácticamente el 100%. Sin duda, *Vibrio* es un género de especial relevancia en el sector acuícola (Vandenberghe *et al.*, 2003), dado el carácter negativo que se le suele asociar, derivado de

su capacidad para generar enfermedades en las especies acuícolas (Mateus *et al.*, 2014), o de origen alimentario en el ser humano (Kim y Lee, 2017). No obstante, su presencia no siempre ha de implicar consecuencias negativas. Así, se han descrito efectos potencialmente positivos, como el posible papel que algunas especies del género pueden desempeñar como vacuna frente a patógenos, tanto del mismo género como de otros de interés acuícola (Peng *et al.*, 2016).

El segundo de los filos que mostró abundancias relativas de importancia fue, como ya se ha citado, Firmicutes (Figura 13). Aunque lejos de los niveles exhibidos por las proteobacterias, aquí también se repite el patrón según el cual la práctica totalidad de los OTUs asignados al filo se asociaron a una sola clase. En este caso, fue la clase Bacilli, con márgenes globales oscilantes entre el 10% y el 32%, y relativos al filo de entre el 95% y casi el 100%. Sólo en el caso de las muestras correspondientes a los tratamientos Control y H-50m se detectaron abundancias relativas pertenecientes a otra clase de cierta importancia. En concreto, Clostridia. Tanto una como otra clase forman parte de la denominada microbiota residente del tracto gastrointestinal de peces (Ghanbari *et al.*, 2015; Piazzon *et al.*, 2019), aunque no suelen alcanzar los niveles de presencialidad de las proteobacterias (Roeselers *et al.*, 2011).

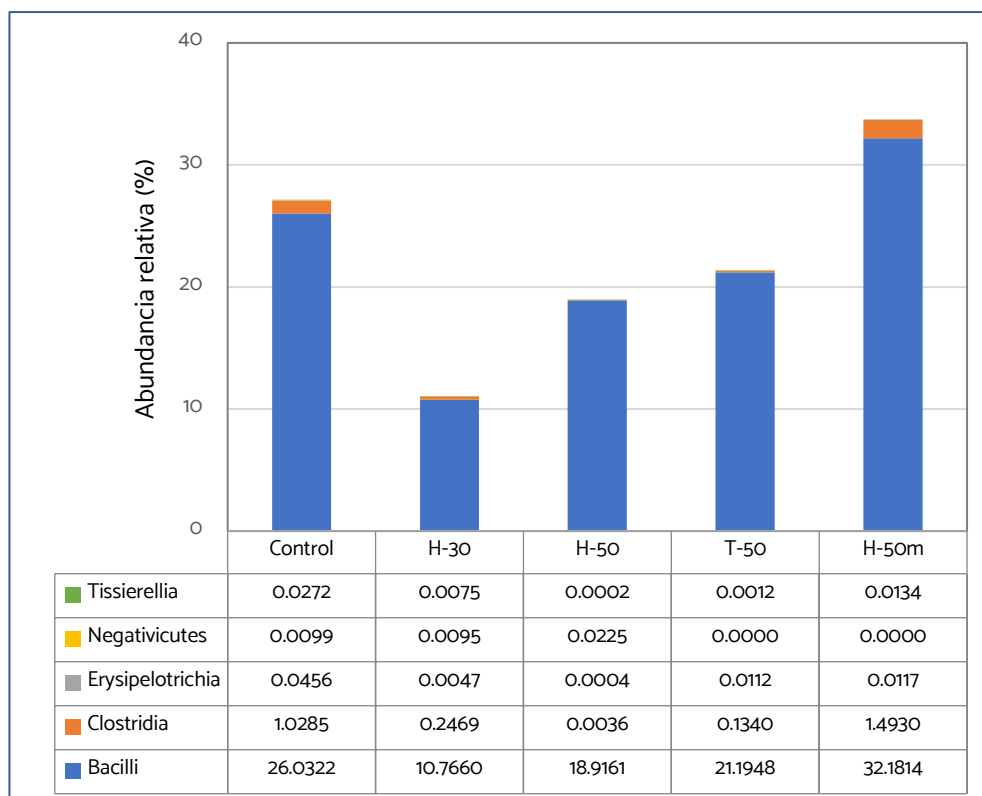


Figura 13. Distribución entre clases en el filo Firmicutes.

Los OTUs asignados a la clase Bacilli quedaron distribuidos en dos órdenes diferentes, Bacillales y Lactobacillales, si bien las abundancias relativas detectadas para el segundo de ellos



fueron considerablemente inferiores, alcanzando niveles de cierta importancia sólo en el caso de las muestras correspondientes al tratamiento Control (Figura 14). Así, la afiliación de OTUs al orden Bacillales superó el 99% de todos los OTUs detectados dentro de la clase Bacilli en el caso de las muestras procedentes de especímenes alimentados con harina de insectos, mientras que en las muestras Control dicho porcentaje descendió al 75%.

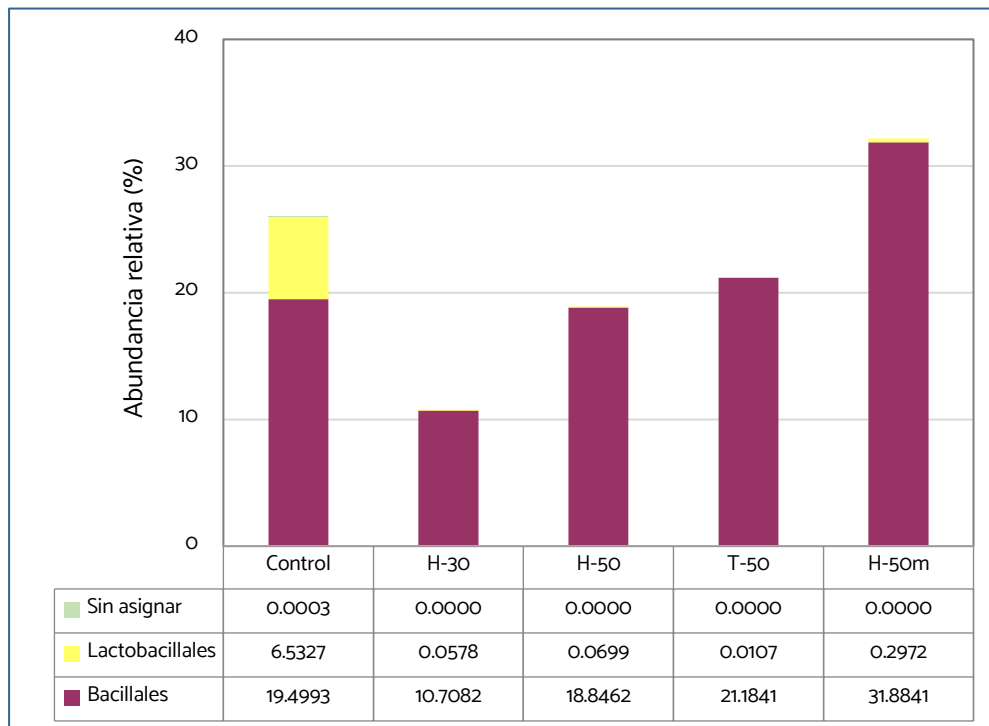


Figura 14. Distribución entre órdenes en la clase Bacilli.

La presencia de especies integradas en el orden Bacillales entre la microbiota propia del tracto gastrointestinal de la dorada o especies similares es un hecho común, si bien se ha descrito que los niveles en los que aparece suelen mostrar dependencia del tipo de dieta suministrada a los especímenes (de Paula Silva *et al.*, 2011; Rimoldi *et al.*, 2020), tal y como sucede en el presente estudio. De forma concreta, y en lo que respecta a poblaciones alimentadas con harina de insectos, se han referenciado incrementos de las abundancias relativas detectadas (Huyben *et al.*, 2019). En el caso de las bacterias pertenecientes al orden Lactobacillales, su presencia también es referenciada como miembro habitual del microbioma intestinal de los peces, llegando incluso, por sus buenas características, a ser consideradas como un indicativo del estado sanitario y de la capacidad de crecimiento del pez (Ikeda-Ohtsubo *et al.*, 2018), aunque entre sus miembros se incluyen algunos patógenos de peces, tales como *Streptococcus iniae* o *Lactococcus garviae* (Gatesoupe, 2008).

El último de los niveles taxonómicos analizado fue el de familia. En la Figura 15 se recoge la distribución del orden Bacillales, dominante entre las muestras, para el nivel taxonómico inmediatamente inferior. Como en anteriores ocasiones, el grueso de los OTUs fue asignado de forma mayoritaria a un solo grupo, en este caso, la familia Bacillaceae, con porcentajes referidos a la abundancia del orden ente el 85% y el 98%. Sólo las muestras correspondientes al tratamiento H-50m escaparon a este perfil, con niveles en torno al 34%, siendo dominantes en este caso, los OTUs sin asignar, que supusieron casi el 60%. Puntualmente, las familias Paenibacillaceae y Planococcaceae alcanzaron abundancias relativas superiores al 1%, en las muestras H-30 y H-50m, respectivamente.

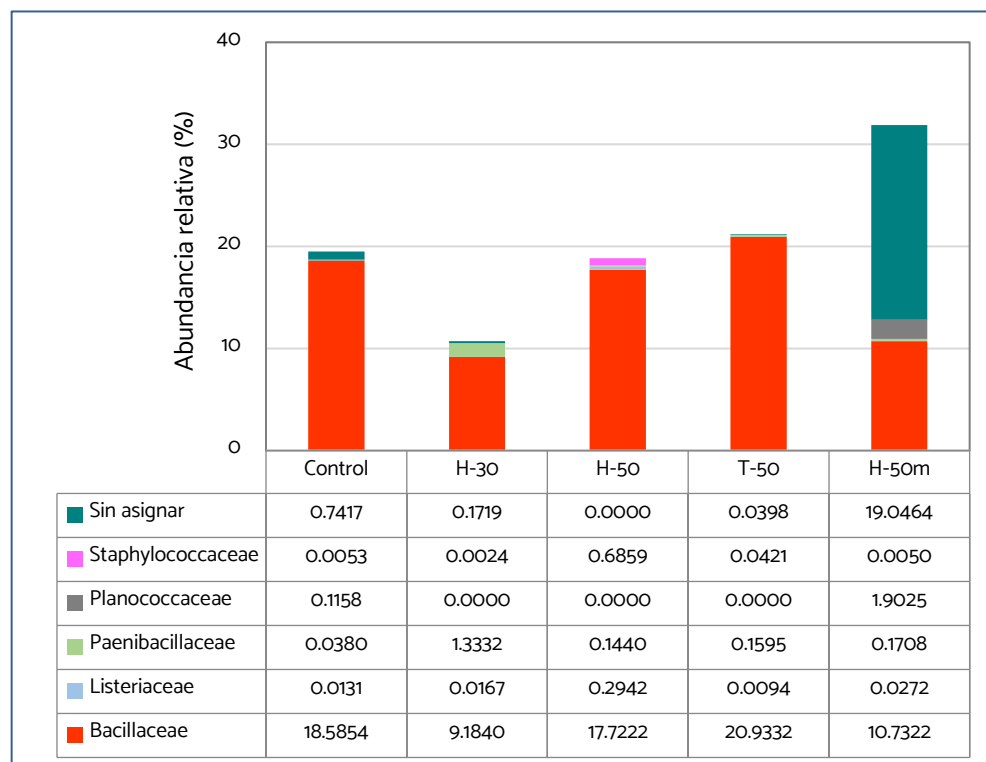


Figura 15. Distribución entre familias en el orden Bacillales.

Representantes de la familia Bacillaceae son miembros habituales de la microbiota gastrointestinal de los peces. La presencia de harina de insectos en las dietas como sustrato sustitutivo influye sobre los niveles en los que aparecen, aunque el sentido de dicha influencia varía en función de las características de los insectos (Huyben *et al.*, 2019). Tales variaciones parecen estar relacionadas con la quitina, de manera que mayores proporciones de este macropolímero inducen superiores abundancias de especies asignadas a esta familia (Li *et al.*, 2021).



5.2.2. Mapa de calor: OTUs dominantes

En la Figura 16 se muestran los grupos microbianos con abundancia relativa superior al 0,5 % en al menos una de las muestras, y los niveles en los que fueron detectados en cada uno de los tratamientos. Se proporcionan las asignaciones al máximo nivel taxonómico encontrado.

Tal y como se ha resaltado en apartados interiores, los OTUs asignados a la familia Vibrionaceae dominaron la microbiota asociada a las muestras analizadas, independientemente de la naturaleza de la dieta con la que fueron alimentados los ejemplares. Las especies pertenecientes al grupo de *Vibrio harveyi* fueron mayoritarias en los peces de las dietas Control y H-50m, mientras que en el resto de muestras prevalecieron miembros del género, sin afiliación a especie concreta, hecho este último que no debe resultar extraño, dados los problemas existentes para discriminar especies evolutivamente cercanas dentro de este género a partir de la aplicación del gen que codifica la subunidad 16S del ARNr (Gómez-Gil *et al.*, 2004).

Las especies pertenecientes al grupo de *Vibrio harveyi*, cinco reconocidas hasta el momento (Cano-Gómez *et al.*, 2015), actúan como patógenos de especies acuáticas, por lo que su presencia en niveles destacados no es deseable. En este sentido, la incorporación parcial en las dietas de harina de insectos, en lugar de la tradicional proteína de pescado, supone una estrategia adecuada, ya que la abundancia relativa de este grupo fue inferior en todas las dietas alternativas al tratamiento control, incluso en aquella en la que continuó siendo el OTU mayoritario, como en el caso de la dieta H-50m. De forma mayoritaria, se produjo un cambio en la población de representantes del género, de manera que los miembros del grupo de *Vibrio harveyii* cedieron el liderazgo a especies pertenecientes al mismo género, pero sin asignación determinada a nivel de especie. Aunque numerosas de las especies incluidas en el género, además de las incluidas en el grupo de *V. harveyii*, actúan como patógenos de peces, algunas otras pueden ejercer el papel opuesto, ya que han sido descritas como agentes probióticos en acuicultura, tal y como sucede en el caso de *V. alginolyticus* (Carnevali *et al.*, 2017). Así, la sustitución de miembros del grupo de *V. harveyii* por otros vibrios sin asignación específica probablemente se traduzca en una reducción del potencial patógeno del microbioma gastrointestinal. En el caso de las muestras H-50m, el descenso en los niveles del grupo de *V. harveyii* en comparación a los observados para las muestras de la dieta Control, fue suplido sólo en parte por un leve ascenso en la densidad poblacional de miembros del género *Vibrio*, ya que el principal incremento se detectó en relación con especies perteneciente al orden Bacillales. Otros estudios han reflejado resultados similares sobre esta comunidad tras la incorporación de harinas elaboradas con *H. illucens* (Terova *et al.*, 2019). Otros integrantes de este orden, mayoritariamente relacionados con *Bacillus subtilis*, también mostraron abundancias relativas de cierta importancia, especialmente en el caso de las dietas Control y T-50. La presencia de este grupo



resulta especialmente interesante, ya que, junto con las bacterias del ácido láctico, constituyen el principal reservorio de especies probióticas en acuicultura (Soltani *et al.*, 2019), con especial incidencia en aspectos de naturaleza inmunomodulatoria (Cerezuela *et al.*, 2013), así como en otros relacionados con la tolerancia a situaciones de estrés y la resistencia a especies patógenas (Kuebutornye *et al.*, 2019).

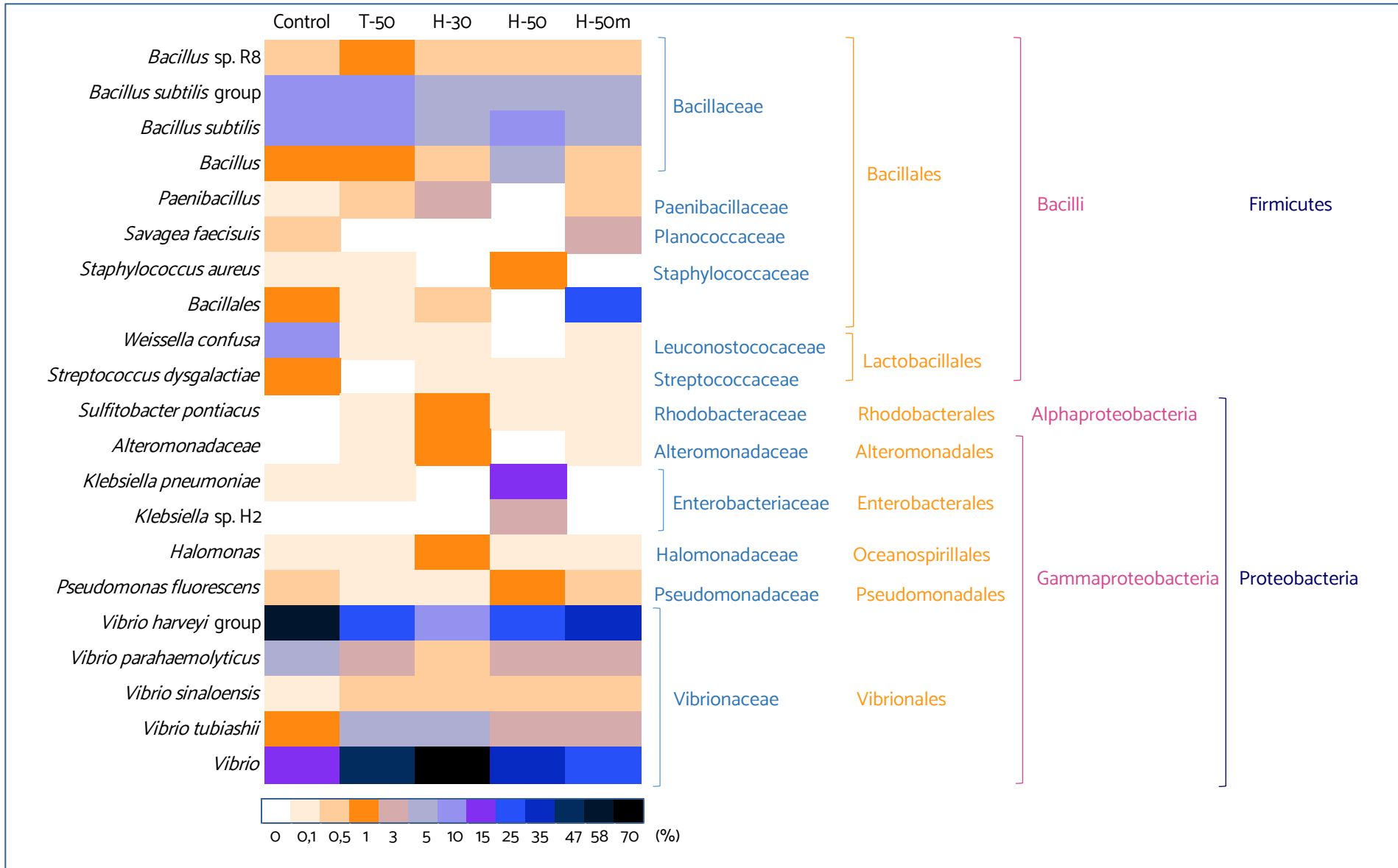


Figura 16. Mapa de calor de los OTUs con abundancias relativas superiores al 0,5%. En el cuadrante derecho se muestra la asignación para los distintos niveles taxonómicos.



El resto de integrantes de la comunidad microbiana dominante en el tracto gastrointestinal no mostró, de forma general, especial relevancia, de manera que ninguna otra especie alcanzó abundancias relativas superiores al 1% en más de uno de los tratamientos. Puntualmente, sí que alguna de estas especies rebasó ese límite citado, como es el caso de *Weissella confusa* en las muestras alimentadas con la dieta Control, o *Klebsiella pneumoniae* en relación con las muestras H-50. La primera, perteneciente al grupo de las bacterias del ácido láctico, aunque ha sido asociada a ciertas patologías humanas de naturaleza infecciosa (Kamboj *et al.*, 2015), no muestra carácter patógeno en relación con peces (Liu *et al.*, 2009), e incluso ha llegado a ser propuesta como probiótico para determinadas especies acuícolas (Sirirat *et al.*, 2008). Con respecto a su posible implicación en procesos patológicos en seres humanos, algunos estudios la relacionan con procesos poliinfecciosos, por lo que su participación real no queda clara y podría tener más relación con la presencia en su genoma de ciertos factores de virulencia, muchos de los cuales también han sido detectados en especies consideradas como seguras por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria, y que muestran un carácter positivo en especies utilizadas como probióticos (Quattrini *et al.*, 2020). Por lo tanto, y desde una perspectiva global, su presencia se podría considerar como mayoritariamente positiva. No puede tener la misma consideración, en cambio, la presencia de *Klebsiella pneumoniae*, una especie calificada como patógeno humano oportunista (Paczosa y Meccas., 2016), aunque las referencias a su detección como componente de la microbiota intestinal de especies acuícolas es relativamente habitual (Tyagi *et al.*, 2019). En ese sentido, la incorporación de harina de insectos en la dieta, puede ejercer cierta influencia en los niveles detectados de esta y otras enterobacterias patógenas, tanto positiva como negativamente. Por una parte, determinados insectos desarrollan cierta actividad antimicrobiana asociada a la presencia de compuestos tales como péptidos antimicrobianos o ácidos grasos (Marusich *et al.*, 2020; Moretta *et al.*, 2020), lo que puede traducirse en una menor abundancia de especies de este grupo en la microbiota intestinal de los peces alimentados con harinas de este origen. Por otra parte, en cambio, las harinas elaboradas a partir de biomasa de insectos pueden aportar densidades poblacionales importantes de enterobacterias, dado que actúan como portadores de tales especies (Schlüter *et al.*, 2017). En ese sentido, la carga de especies patógenas parece estar influenciada por diversos factores, tales como la alimentación de los insectos (Zhineng *et al.*, 2021) o el tipo de procesado (Klunder *et al.*, 2012), lo que podría explicar resultados inicialmente contradictorios como los que se observan en este trabajo, en el que sólo uno de los tratamientos dio lugar a abundancias potencialmente problemáticas.



En términos generales, y en lo que respecta al microbioma intestinal, se deduce del presente estudio que la sustitución parcial de la tradicional harina de pescado por harina de insectos en la elaboración de dietas destinadas a la alimentación de especies en acuicultura, generó cambios en la identidad de los microorganismos determinantes más relacionados con redistribuciones de las abundancias relativas entre grupos filogenéticamente próximos ya presentes, que con modificaciones profundas de los grupos microbianos asociados a cada una de las muestras, ya sea en cuanto a transferencias poblacionales entre niveles taxonómicos superiores o a la aparición de nuevas especies. Por otra parte, las diferencias promovidas con respecto a la dieta Control parecen ser menores si la harina es tratada para adecuar su composición en cuantos a componentes de naturaleza grasa. Adicionalmente, también se observó la existencia de cierta influencia ligada a los niveles de sustitución utilizados, y no tanto a la especie empleada en la elaboración de la harina, como se desprende del análisis de conglomerados. A partir de este análisis se observó mayor semejanza entre las comunidades microbianas asociadas a las dietas con niveles superiores de sustitución de harina de pescado, que entre aquellas en las que la fracción sustituyente se elaboró con harina procedente del mismo insecto. La existencia de diferencias provocadas por distintos niveles de sustitución ya ha sido descrita en anteriores ocasiones (Bruni *et al.*, 2018; Zarantoniello *et al.*, 2020), si bien no resulta sencillo establecer si el factor concentración muestra más influencia que el factor origen de la harina, ya que los estudios en los que se incluyen harina de insectos elaboradas a partir de distintas especies son realmente escasos y no suelen incluir distintos niveles de cada uno de los insectos ensayados (Józefiak *et al.*, 2019b). Estudios realizados sobre especies de carácter no acuícola sí parecen replicar estos resultados (Benzertihá *et al.*, 2019), aunque resulta arriesgado extrapolar conclusiones, no sólo por la utilización de distintas especies, sino por la variabilidad de las condiciones en las que se llevan a cabo los ensayos.

Otro de los factores ensayados, la modificación de la fracción grasa presente en la harina de insecto, suele ser objeto de estudio de los trabajos centrados en el análisis de las bondades de la harina de insecto como posible integrante de las dietas utilizadas en acuicultura, ya que puede afectar el grado su digestibilidad (Basto *et al.*, 2020). En este sentido, y dado que la digestibilidad se encuentra ligada a la composición nutricional de los piensos, es lógico que también pueda influir en las comunidades microbianas presentes en el tracto gastrointestinal. Los resultados derivados del presente estudio muestran como la dieta tratada para modificar su fracción grasa presentó el mayor grado de homología con la dieta control, quedando fuera del clúster constituido por el resto de las dietas con inclusión de harina de insecto. Sin embargo, y tal como se ha apuntado anteriormente, no es posible establecer si esta es una respuesta generalizada, dada la ausencia de literatura que



analice este tipo de parámetros. No obstante, uno de los escasos trabajos en los que se ha estudiado esta posibilidad en ejemplares de codorniz, se ha observado mayor homología entre las poblaciones microbianas de las dietas control y modificada en la fracción grasa, que entre esta última y la no modificada (Dalle Zotte *et al.*, 2021).

6. CONCLUSIONES

1. La inclusión de harina de insecto de las especies *Tenebrio molitor* y *Hermetia illucens* en las dietas destinadas a la alimentación de dorada (*Sparus aurata*) propicia cambios en el microbioma intestinal de los ejemplares que las consumen, aunque, en todos los casos, la microbiota se encuentra dominada por representantes integrados en los órdenes Vibrionales y, en menor medida, Bacillales.
2. De forma mayoritaria, los cambios se relacionan más con una redistribución de las densidades poblacionales de las comunidades presentes, que con la incorporación de nuevas especies o la desaparición de existentes.
3. Los niveles de inclusión de la harina de insecto parecen moldear el microbioma gastrointestinal en mayor medida que la especie de insecto utilizada en la elaboración de la harina.
4. El tratamiento de la harina de insecto para modificar su fracción grasa reduce el impacto sobre el microbioma gastrointestinal, de manera que se conserva un mayor grado de homología con respecto a la dieta Control.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Antonopoulou, E., Nikouli, E., Piccolo, G., Gasco, L., Gai, F., Chatzifotis, S., Mente, E. y Kormas, K. A. (2019). Reshaping gut bacterial communities after dietary *Tenebrio molitor* larvae meal supplementation in three fish species. *Aquaculture*, *503*, 628-635.
- Asociación Empresarial de Acuicultura de España, APROMAR (2020). La acuicultura en España. <http://www.apromar.es/content/informes-anales> (Última consulta 20 de febrero de 2021).
- Barragan-Fonseca, K. B., Dicke, M. y van Loon, J. J. (2017). Nutritional value of the black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) and its suitability as animal feed—a review. *J. Insects as Food Feed*, *3*(2), 105-120.
- Basto, A., Matos, E. y Valente, L.M.P. (2020). Nutritional value of different insect larvae meals as protein sources for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, *521*, 735085.
- Bauchot, M. L. (1990). Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). Sparidae. En: Quero, J. C., Hureau, J. C., Karrer, C., Post, A. y Saldanha, L. JNICT-Portugal, SEI-France, pp. 790-812.
- Benzertiha, A., Kieronczyk, B., Rawski, M., Józefiak, A., Kozłowski, K., Jankowski, J. y Józefiak, D. (2019). *Tenebrio molitor* and *Zophobas morio* full-fat meals in broiler chicken diets: Effects on nutrients digestibility, digestive enzyme activities, and cecal microbiome. *Animals*, *9*, 1128.
- Bruni, L., Pastorelli, R., Viti, C., Gasco, L. y Parisi, G. (2018). Characterisation of the intestinal microbial communities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with *Hermetia illucens* (black soldier fly) partially defatted larva meal as partial dietary protein source. *Aquaculture*, *487*, 56-63.
- Bureau, D. P., Harris, A. M. y Cho, C. Y. (1999). Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, *180*(3-4), 345-358.
- Cano-Gómez, A., Høj, L., Owens, L., Baillie, B. K. y Andreakis, N. (2015). A multiplex PCR-based protocol for identification and quantification of *Vibrio harveyi*-related species. *Aquaculture*, *437*, 195-200.
- Carnevali, O., Maradonna, F. y Gioacchini, G. (2017). Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture*, *472*, 144-155.
- Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S. T., Meseguer, J., Moriñigo, M. A. y Esteban, M. A. (2013). Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin



- and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) specimens. *Fish Shellfish Immunol.*, *34*, 1063-1070.
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J. K., Poole, A. C., Srinivasan, S., Ley, R. E. y Gewirtz, A. T. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*, *519*(7541), 92-96.
- Chen, F., Xiao, Y., Wu, X., Zhong, Y., Lu, Q. y Zhou, W. (2020). Replacement of feed by fresh microalgae as a novel technology to alleviate water deterioration in aquaculture. *RSC Adv.*, *10*, 20794-20800.
- Chun, S. J., Cui, Y., Ahn, C. Y. y Oh, H. M. (2018). Improving water quality using settleable microalga *Ettlia* sp. And the bacterial community in fresh water recirculating aquaculture system of *Danio rerio*. *Water Res.*, *135*, 112-121.
- Colloca, F. y Cerasi, S. (2005). Programa de información de especies acuáticas. *Sparus aurata*. Departamento de Pesca y Acuicultura. FAO. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/es (Última consulta 20 de febrero de 2021).
- Comisión Europea (2017). Food from the oceans. High Level Group of Scientific Advisors. Scientific Opinion No. 3. doi:10.2777/66235
- Comisión Europea (2021). Denominaciones comerciales de los productos de la pesca y la acuicultura. Scandinavian Fishing Year Book. https://mare.istc.cnr.it/fisheriesv2/species_es?sn=34269 (Última consulta 20 de febrero de 2021).
- Commission Regulation (EU) (2017). 2017/893 of 24 May 2017 amending Annexes I and IV to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council and Annexes X, XIV and XV to Commission Regulation (EU) No 142/2011 as regards the provisions on processed animal protein. Official Journal of the European Union, L 138/92-116.
- Commission Regulation (EU) (2013). N° 56/2013 of 16 January 2013 Amending Annexes I and IV to Regulation (EC) N° 999/2001 of the European Parliament and of the Council Laying Down Rules for the Prevention, Control and Eradication of Certain Transmissible Spongiform.
- Dalle Zotte, A., Singh, Y., Squartini, A., Stevanato, P., Cappellozza, S., Kovitvadhi, A., Subaneg, S., Bertelli, D. y Cullere, M. (2021). Effect of dietary inclusion of full-fat or defatted silkworm pupa meal on the nutrient digestibility and faecal microbiome of fattening quails. *Animal*, *15*, 100112.



- De Mitcheson, Y.S. y Liu, M. (2008). Functional hermaphroditism in teleosts. *Fish Fish.*, *9*, 1-43. doi: 10.1111/j.1467-2979.2007.00266.x.
- De Paula Silva, F. C., Nicoli, J. R., Zambonino-Infante, J. L., Kaushik, S. y Gatesoupe, F. J. (2011). Influence of the diet on the microbial diversity of faecal and gastrointestinal contents in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and intestinal contents in goldfish (*Carassius auratus*). *FEMS Microbiol. Ecol.*, *78*, 285-296.
- Devic, E., Leschen, W., Murray, F. y Little, D. C. (2018). Growth performance, feed utilization and body composition of advanced nursing Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) larvae meal. *Aquac. Nutr.*, *24*(1), 416-423.
- Diclaro II, J. W. y Kaufman, P. E. (2009). Black soldier fly *Hermetia illucens* Linnaeus (Insecta: Diptera: Stratiomyidae). EENY-461, Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Diener, S., Zurbrügg, C., Roa Gutiérrez, F., Nguyen Dang Hong, Morel, A., Koottatep, T. y Tockner, K. (2011). Black soldier fly larvae for organic waste treatment – prospects and constraints. WasteSafe 2011 – 2nd Int. Conf. on Solid Waste Management in the Developing Countries, 13-15 February 2011, Khulna, Bangladesh, 52-59.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clement, J.C., Quince, C., Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, *27*, 2194-2200.
- El-Haroun, E. R., Azevedo, P. A. y Bureau, D. P. (2009). High dietary incorporation levels of rendered animal protein ingredients on performance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972). *Aquaculture*, *290*(3-4), 269-274.
- Elsherief, M. F., Mousa, M. M., El-Galil, H. A. y El-Bahy, E. F. (2014). Enterobacteriaceae associated with farm fish and retailed ones. *Alex. J. Vet. Sci.*, *42*, 99-104.
- FAO. (2012). Alimentar al sector de la acuicultura en crecimiento: un análisis. <http://www.fao.org/3/a-mc825s.pdf> (Última consulta 20 de febrero de 2021).
- FAO. (2019). Aquaculture topics and activities. Acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura. Roma. <http://www.fao.org/fishery/> (Última consulta 20 de febrero de 2021).
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es> (Última consulta 7 de marzo de 2021).



- Ferriol Molina, M. y Merle Farinós, H. (2012). Los componentes alfa, beta y gamma de la biodiversidad. Aplicación al estudio de comunidades vegetales. Universidad Politécnica de Valencia. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16285/Microsoft%20Word%20-%20articulo%20docente%20def.pdf?sequence=1> (Última consulta 20 de febrero de 2021).
- Finke, M. D. (2002). Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biol.*, 21(3): 269-285.
- Fu, L., Niu y B., Zhu, Z., Wu, S. y Li, W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28: 3150-3152.
- Gajardo, K., Rodiles, A., Kortner, T. M., Kroghdal, A., Bakke, A. M., Merrifield, D. L. y Sørum, H. (2016). A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): A basis for comparative gut microbial research. *Sci. Rep.*, 6, 1-10.
- Garza, D. R. y Dutilh, B. E. (2015). From cultured to uncultured genome sequences: metagenomics and modeling microbial ecosystems. *Cell. Mol. Life Sci.*, 72(22), 4287-4308.
- Gasco, L., Belforti, M., Rotolo, L., Lussiana, C., Parisi, G., Terova, G., Roncarati, A. y Gai, F. (2014). Mealworm (*Tenebrio molitor*) as a potential ingredient in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). En: Abstract book Conference "Insects to Feed The World" The Netherlands (pp. 14-17).
- Gatesoupe, F. J. (2008). Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: Natural occurrence and probiotic treatments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 14, 107-114.
- George, I., Stenuit, B. y Agathos, S. N. (2010). Application of metagenomics to bioremediation. *Metagenomics: Theory Methods and Applications* 1: 119-140.
- Ghanbari, M., Kneifel, W. y Domig, K. J. (2015). A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, 448, 464-475.
- Givens, C. E., Ransom, B., Bano, N. y Hollibaugh, J. T. (2015). Comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 518, 209-223.
- Gianoulis, T. A., Raes, J., Patel, P. V., Bjornson, R., Korbil, J. O., Letunic, I., ... y Bork, P. (2009). Quantifying environmental adaptation of metabolic pathways in metagenomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(5), 1374-1379.
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., ... y Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327(5967), 812-818.



- Gómez, D., Sunyer, J. O. y Salinas, I. (2013). The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1729-1739.
- Gómez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., García-Gasca, A., Roque, A., Vázquez-Juárez, R., Thompson, F. L. y Swings, J. (2004). Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*, 150, 1769-1777.
- Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Peniche, C. y Higuera-Ciapara, I. (2000). Chitin and chitosan. In *Developments in Food Science* (Vol. 41, pp. 265-308). Elsevier.
- Green, T. J., Smullen, R. y 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(1-2), 286-292.
- Hardouin, J. y Mahoux, G. (2003). Zootechnie d'insectes - Elevage et utilisation au bénéfice de l'homme et de certains animaux. Bureau pour l'Echange et la Distribution de l'Information sur le Mini-élevage (BEDIM), 164 p.
- Henry, M., Gasco, L., Piccolo, G. y Fountoulaki, E. (2015). Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 203, 1-22.
- Henry, M. A., Gasco, L., Chatzifotis, S. y Piccolo, G. (2018). Does dietary insect meal affect the fish immune system? The case of mealworm, *Tenebrio molitor* on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Developmental & Comparative Immunology*, 81, 204-209.
- Hernández de Lira, I. O., Huber, D., Luévanos-Escareño, M. P., Hernández Terán, F., Sáenz-Mata, J. y Balagurusamy, N. (2014). Metagenómica: concepto y aplicaciones en el mundo microbiano. *MC Cueto Wong, NM de la Fuente Slacido y MP Luévanos Escareño, Fronteras en microbiología aplicada*, 156-175.
- Hua, K. (2021). A meta-analysis of the effects of replacing fish meals with insect meals on growth performance of fish. *Aquaculture*, 530, 735732.
- Huyben, D., Vidaković, A., Hallgren, S. W. y Langeland, M. (2019). High-throughput sequencing of gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed larval and pre-pupae stages of black soldier fly (*Hermetia illucens*). *Aquaculture*, 500, 485-491.
- Iaconisi, V., Bonelli, A., Pupino, R., Gai, F. y Parisi, G. (2018). Mealworm as dietary protein source for rainbow trout: Body and fillet quality traits. *Aquaculture*, 484, 197-204.



- Ikeda-Ohtsubo, W., Brugman, S., Warden, C. H., Rebel, J. M. J., Folkerts, G. y Pieterse, C. M. J. (2018). How can we define “optimal microbiota?”: A comparative review of structure and functions of microbiota of animals, fish, and plants in agricultura. *Front. Nutr.*, 5, 90.
- Integrated Taxonomic Information System, ITIS (2020). Base de datos on-line. <http://www.itis.gov>. (Última consulta 7 de marzo de 2021).
- Józefiak, A., Nogales-Mérida, S., Mikołajczak, Z., Rawski, M., Kierończyk, B. y Mazurkiewicz, J. (2019a). The utilization of full-fat insect meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) nutrition: The effects on growth performance, intestinal microbiota and gastrointestinal tract histomorphology. *Annals of Animal Science*, 19(3), 747-765.
- Józefiak, A., Nogales-Mérida, S., Rawski, M., Kieronczyk, B. y Mazurkiewicz, J. (2019b). Effects of insect diets on the gastrointestinal tract health and growth performance of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869). *BMC Vet. Res.*, 15, 348.
- Kamboj, K., Vasquez, A. y Balada-Llasat, J. M. (2015). Identification and significance of *Weissella* species infections. *Front. Microbiol.*, 6, 1204.
- Kim, J. Y. y Lee, J. L. (2017). Correlation of total bacterial and *Vibrio* spp. populations between fish and water in the aquaculture system. *Front. Mar. Sci.*, 4, 147.
- Klasing, K. C., Thacker, P., Lopez, M. A. y Calvert, C. C. (2000). Increasing the calcium content of mealworms (*Tenebrio molitor*) to improve their nutritional value for bone mineralization of growing chicks. *J. Zoo Wildlife Med.*, 31(4): 512-517.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primer for classical and next-generation-sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.*, 41: e1.
- Klunder, H. C., Wolkers-Rooijackers, J., Korpela, J. M. y Nout, M. J. R. (2012). Microbiological aspects of processing and storage edible insects. *Food Control*, 26, 628-631.
- Kroeckel, S., Harjes, A. G. E., Roth, I., Katz, H., Wuertz, S., Susenbeth, A. y Schulz, C. (2012). When a turbot catches a fly: evaluation of a pre-pupae meal of the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute - growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 364/365: 345-352.
- Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D. y Lu, Y. (2019). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.*, 87, 820-828.



- Larsen, A. M., Mohammed, H. H. y Arias, C. R. (2014). Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. *J. Appl. Microbiol.*, 116, 1396-1404.
- Lazzarotto, V., Corraze, G., Leprevost, A., Quillet, E., Dupont-Nivet, M. y Médale, F. (2015). Three-year breeding cycle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a plant-based diet, totally free of marine resources: consequences for reproduction, fatty acid composition and progeny survival. *PLoS one*, 10 (2), e0117609.
- Li, W. y Godzik, A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 26: 1658-1659.
- Li, J., Ni, J., Li, J., Wang, C., Li, X., Wu, S., ... y Yan, Q. (2014). Comparative study on gastrointestinal microbiota of eight fish species with different feeding habits. *Journal of Applied Microbiology*, 117(6), 1750-1760.
- Li, Y., Bruni, L., Jaramillo-Torres, A., Gajardo, K., Kortner, T. M. y Krogdahl, A. (2021). Differential response of digesta- and mucosa-associated intestinal microbiota to dietary insect meal during the seawater phase of Atlantic salmon. *Anim. Microbiome*, 3, 8.
- Liu, J. Y., Li, A. H., Ji, C. y Yanf, W. M. (2009). First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Vet. Microbiol.*, 136, 314-320.
- Llagostera, P. F., Kallas, Z., Reig, L., y de Gea, D. A. (2019). The use of insect meal as a sustainable feeding alternative in aquaculture: current situation, Spanish consumers' perceptions and willingness to pay. *Journal of Cleaner Production*, 229, 10-21.
- Lloris, D. (2005). A world overview of species of interest to fisheries. Chapter: *Sparus aurata*. <http://www.fao.org/figis/servlet/species?fid=2384> (Última consulta 7 de febrero de 2021).
- Lock, E. R., Arsiwalla, T. y Waagbø, R. (2016). Insect larvae meal as an alternative source of nutrients in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) postmolt. *Aquaculture Nutrition*, 22, 1202-1213.
- Lorenz, P. y Eck, J. (2005). Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology*, 3(6), 510-516.
- Lu, R., Chen, Y., Yu, W., Lin, M., Yang, G., Qin, C., Meng, X., Zhang, Y., Ji, H. y Nie, G. (2020). Deffated black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal can replace soybean meal in juvenile Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) diets. *Aquac. Rep.*, 18, 100520.



- Lyons, p. P., Turnbull, J. F., Dawson, K. A. y Crumlish, M. (2017). Effects of low-level dietary microalgae supplementation on the distal intestinal microbiome of farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Res.*, *48*, 2438-2452.
- Makkar, H. P., Tran, G., Heuzé, V. y Ankers, P. (2014). State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, *197*, 1-33.
- Mamuad, L., Lee, S. H., Jeong, C. D., Ramos, S., Miguel, M., Son, A. R., Kim, S. H., Cho, Y. I. y Lee, S. S. (2021). Ornamental fish, *Cyprinus carpio*, fed with fishmeal replacement *Ptecticus tenebrifer* and *Tenebrio molitor*. *Aquac. Res.*, *52*, 980-990.
- Marono, S., Piccolo, G., Loponte, R., Di Meo, C., Attia, Y. A., Nizza, A. y Bovera, F. (2015). *In vitro* crude protein digestibility of *Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens* insect meals and its correlation with chemical composition traits. *Ital. J. Anim. Sci.*, *14*, 3889.
- Marusich, E., Mohamed, H., Afanasev, Y. y Leonov, S. (2020). Fatty acids from *Hermetia illucens* larvae fat inhibit the proliferation and growth of actual phytopathogens. *Microorganisms*, *8*, 1423.
- Mateus, L., Costa, L., Silva, Y. J., Pereira, C., Cunha, A. y Almeida, A. (2014). Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. *Aquaculture*, *424-425*, 167-173.
- Martín, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.*, *17*, 10-12.
- Martínez-Córdova, L. R., Martínez-Porchas, M. y Cortés-Jacinto, E. (2009). Camaronicultura mexicana y mundial: ¿actividad sustentable o industria contaminante? *Revista internacional de contaminación ambiental*, *25(3)*, 181-196.
- Martínez-Porchas, M. y Vargas-Albores, F. (2017). Microbial metagenomics in aquaculture: a potential tool for a deeper insight into the activity. *Reviews in Aquaculture*, *9(1)*, 42-56.
- Michaud, L., Lo Giudice, A., Troussellier, M., Smedile, F., Bruni, V. y Blancheton, J. P. (2009). Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system. *J. Appl. Microbiol.*, *107*, 1935-1946.
- Mikolajczak, Z., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Kieronczyk, B. y Józefiak, D. (2020). The effect of hydrolyzed insect meals in sea trout fingerling (*Salmo trutta* m. *trutta*) diets on growth performance, microbiota nad biochemical blood parameters. *Animals*, *10*, 1031.



- Moretta, A., Salvia, R., Scieuzo, C., Di Somma, A., Vogel, H., Pucci, P., Sgambato, A., Wolff, M. y Falabella, P. (2020). A bioinformatic study of antimicrobial peptides identified in the black soldier fly (BSF) *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Sci. Rep.*, *10*, 16875.
- Muus, B. J., Nielsen, J. G., Dahlstrom, P., y Nystrom, B. O. (1999). Sea fish. Scandinavian Fishing Year Book-Hedehusene.
- Nawaz, A., Irshad, S., Hoseinifar, S. H. y Xiong, H. (2018). The functionality of prebiotics as immunostimulant: Evidences from trials on terrestrial and aquatic animals. *Fish & shellfish immunology*, *76*, 272-278.
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquac. Res.*, *41*, 1553-1573.
- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Bureau, D. P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A. P., ... y Nichols, P. D. (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(36), 15103-15110.
- Newton, G. L., Sheppard, D. C. y Burtle, G. (2008). Black soldier fly prepupae: a compelling alternative to fish meal and fish oil. Public comment on alternative feeds for aquaculture, NOAA 15/11//2007 - 29/2/2008.
- Nikouli, E., Meziti, A., Antonopoulou, E., mente, E. y Kormas, K. A. (2018). Gut bacterial communities in geographically distant populations of farmed sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Microorganisms*, *6*, 92.
- Observatorio Español de Acuicultura, OESA (2020). Guía para periodistas sobre acuicultura. Fundación Biodiversidad, Madrid, España.
- Oliva-Teles, A., Enes, P. y Peres, H. (2015). Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish. *Feed and feeding practices in aquaculture* (pp. 203-233). Woodhead Publishing.
- Oonincx, D.G.A.B., van Itterbeeck, J., Heetkamp, M.J.W., van den Brand, H., van Loon, J.J.A. y van Huis, A. (2010). An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. *PLoS ONE*, *5*, e14445.
- Ortiz, J. C., Ruiz, A. T., Morales-Ramos, J. A., Thomas, M., Rojas, M. G., Tomberlin, J. K., ... y Jullien, R. L. (2016). Insect mass production technologies. In *Insects as sustainable food ingredients* (pp. 153-201). Academic Press.



- Paczosa, M. K. y Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *80*, 629-661.
- Parlapini, F. F., Boziaris, I. S., Meziti, A., Michailidou, M., Haroutounian, S. A., Argiriou, A. y Karapanagiotidis, I. T. (2019). Microbiological status based on 454-pyrosequencing and volatilome analysis of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed on diets with hydrolyzed feather meal and poultry by-product meal as fishmeal replacers. *Eur. Food Res. Technol.*, *245*, 1409-1420.
- Parris, D. J., Brooker, R. M., Morgan, M. A., Dixon, D. L. y Stewart, F. J. (2016). Whole gut microbiome composition of damselfish and cardinalfish before and after reef settlement. *PeerJ*, *4*, e2412.
- Peng, B., Ye, J. Z., Zeng, L., Zhang, J. Y. y Li, H. (2016). Identification of polyvalent protective immunogens from outer membrane proteins in *Vibrio parahaemolyticus* to protect fish against bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.*, *54*, 204-210.
- Pérez, T., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., Halaihel, N., Vendrell, D., De Blas, I. y Múzquiz, J. L. (2010). Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal immunology*, *3*(4), 355-360.
- Piazzon, M. C., Naya-Catalá, F., Perera, E., palenzuela, O., Sitjà-Bobadilla, A. y Pérez-Sánchez, J. (2020). Genetic selection for growth drives differences in intestinal microbiota composition and parasite disease resistance in gilthead sea bream. *Microbiome*, *8*, 168.
- Piazzon, M. C., Naya-Catalá, F., Simó-Mirabet, P., Picard-Sánchez, A., Roig, F. J., Caldúch-Giner, J. A., Sitjà-Bobadilla, A. y Pérez-sánchez, J. (2019). Sex, age, and bacteria: How the intestinal microbiota is modulated in a protandrous hermaphrodite fish. *Front. Microbiol.*, *10*, 2512.
- Pinterest (2020). Mosca soldado, ¿aliada del compost? <https://ar.pinterest.com/pin/832321574855674279/> (Última consulta: 7 de febrero de 2021).
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, *31*(8), 583-590.
- Quattrini, M., Korcari, D., Ricci, G. y Fortina, M.G. (2020). A polyphasic approach to characterize *Weissella cibaria* and *Weissella confusa* strains. *J. Appl. Microbiol.*, *128*, 500-512.
- Quince, C., Lundin, E. E., Andreasson, A. N., Greco, D., Rafter, J., Talley, N. J., ... y D'Amato, M. (2013). The impact of Crohn's disease genes on healthy human gut microbiota: a pilot study. *Gut*, *62*(6), 952-954.



- Ramos-Elorduy, J., Avila González, E., Rocha Hernández, A. y Pino, J. M. (2002). Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens. *J. Econ. Entomol.*, 95 (1): 214-220
- Ray, A. K., Ghosh, K. y Ringø, E. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*, 18(5), 465-492.
- Renna, M., Schiavone, A., Gai, F., Dabbou, S., Lussiana, C., Malfatto, V., Prearo, M., Cappuchio, M. T., Biasato, I., Biasibetti, E., De Marco, M., Brugiaplaga, A., Zoccarato, I. y Gasco, L. (2017). Evaluation of the suitability of a partially defatted black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal as ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) diets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8, 57.
- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D. y Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 525-552.
- Rimoldi, S., Gini, E., Iannini, F., Gasco, L., y Terova, G. (2019). The effects of dietary insect meal from *Hermetia illucens* prepupae on autochthonous gut microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animals*, 9(4), 143.
- Rimoldi, S., Gini, E., Koch, J. F. A., Iannini, F., Brambilla, F. y Terova, G. (2020). Effects of hydrolyzed fish protein and autolyzed yeast as substitutes of fishmeal in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diet, on fish intestinal microbiome. *BMC Vet. Res.*, 16, 118.
- Ringø, E., Strøm, E. y Tabachek, J. A. (1995). Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture Research*, 26(10), 773-789.
- Roeselers, G., Mittge, E. K., Stephens, W. Z., Parichy, D. M., Cavanaugh, C. M., Guillemin, K. y Rawls, J.F. (2011). Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME J.*, 5, 1595-1608.
- Romero, J., Ringø, E., y Merrifield, D. L. (2014). The gut microbiota of fish. *Aquaculture nutrition: Gut health, probiotics and prebiotics*, 75-100.
- Sánchez-Muros, M. J., de Haro, C., Guil, J. L. y Barroso, F. G. (2017). Effect of feeding in juvenile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) with diet contain *Tenebrio molitor* meal (Order Coleoptera). *Annals of Aquaculture and Research*, 4, 1039.
- Santigosa, E., García-Meilán, I., Valentin, J. M., Pérez-Sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S. y Gallardo, M. A. (2011). Modifications of intestinal nutrient absorption in response to dietary fish meal



- replacement by plant protein sources in sea bream (*Sparus aurata*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 317(1-4), 146-154.
- Schmieder, R. y Edwards, R. (2012). Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future microbiology*, 7(1), 73-89.
- Schlüter, O., Rumpold, B., Holzhauser, T., Roth, A., Vogel, R. F., Quasigroch, W., Vogel, S., Heinz, V., Jäger, H., Bandick, N., Kulling, S., Knorr, D., Steinberg, P. y Engel, K. H. (2017). Safety aspects of the production of foods and food ingredients from insects. *Mol. Nutr. Food Res.*, 61, 600520.
- Sirirat, R., Thosaporn, R. y Somkiat, P. (2008). Evaluation of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. *Aquac. Res.*, 39, 134-143.
- Soltani, M., Ghosh, K., Hoseinifar, S. H., Kumar, V., Limbery, A. J., Roy, S. y Ringø, E. (2019). Genus *Bacillus*, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. *Rev. Fish. Sci. Aquac.*, 27, 331-379.
- Spranghers, T., Michiels, J., Vrancx, J., Obyn, A., Eeckhout, M., De Clercq, P. y De Smet, S. (2018). Gut antimicrobial effects and nutritional value of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) prepupae for weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology*, 235, 33-42.
- Tacon, A. G., y Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285(1-4), 146-158.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., y Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Terova, G., Gini, E., Gasco, L., Moroni, F., Antonini, M., y Rimoldi, S. (2021). Effects of full replacement of dietary fishmeal with insect meal from *Tenebrio molitor* on rainbow trout gut and skin microbiota. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 12, Artículo 30.
- Terova, G., Rimoldi, S., Ascione, C., Gini, E., Ceccotti, C. y Gasco, L. (2019). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut microbiota is modulated by insect meal from *Hermetia illucens* prepupae in the diet. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 29(2), 465-486
- Tran G., Gnaedinger C. y Mélin C. (2015). Black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. <https://www.feedipedia.org/node/16388> (Última consulta 7 de febrero de 2021).



- Tyagi, A., Singh, B., Thammegowda, N. K. B. y Singh, N. K. (2019). Shotgun metagenomics offers novel insights into taxonomic compositions, metabolic pathways and antibiotic resistance genes in fish gut microbiome. *Arch. Microbiol.*, 201, 295-303.
- Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G. y Vantomme, P. (2013). Edible Insects: Future Prospects for Food and Feed Security. FAO. Roma. <http://www.fao.org/3/i3253e/i3253e.pdf>. (Última consulta: 20 de febrero de 2021).
- Vandenberghe, J., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B. y Swings, J. (2003). Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture*, 219, 9-20.
- Vetrovsky, T. y Baldrian, P. (2013). The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterail community analyses. *PLoS One*, 8, e57923.
- Viaorganica (2015). Cómo criar tenebrios (gusanos de la harina) para alimento de gallina <https://viaorganica.org/como-criar-tenebrios-gusanos-de-la-harina-para-alimento-de-gallina/> (Última consulta 7 de febrero de 2021).
- Wang, A. R., Ran, C., Ringø, E. y Zhou, Z. G. (2018). Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 626-640.
- Ward, N. L., Steven, B., Penn, K., Methé, B. A. y Detrich, W. D. (2009). Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish species. *Extremophiles*, 13, 679-685.
- Xue, S., Xu, W., Wei, J. y Sun, J. (2017). Impact of environmental bacterial communities on fish health in marine recirculating aquaculture systems. *Vet. Microbiol.*, 203, 34-39.
- Yan, Q., Van Der Gast, C. J. y Yu, Y. (2012). Bacterial community assembly and turnover within the intestines of developing zebrafish. *PLoS One*, 7(1), e30603.
- Yukgehnaish, K., Kumar, P., Sivachandran, P., Marimuthu, K., Arshad, A., Paray, B. A. y Arockiaraj, J. (2020). Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. *Reviews in Aquaculture* 1-25. doi: 10.1111/raq.12416.
- Zarantoniello, M., Randazzo, B., Gioacchini, G., Truzzi, C., Giorgini, E., Riolo, P., Gioia, G., Bertolucci, C., Osimani, A., Cardinaletti, G., Lucon-Xiccato, T., Milanovic, V., Annibaldi, A., Tulli, F., Notarstefano, S., Clementi, F. y Olivotto, I. (2020). Zebrafish (*Danio rerio*) physiological and behavioural responses to insect-based diets: a multidisciplinary approach. *Sci. Rep.*, 10, 10648.
- Zhang, X. X., Zhang, T. y Fang, H. H. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied microbiology and biotechnology*, 82(3), 397-414.



- Zhang, J. X., Guo, L. Y., Feng, L., Jiang, W. D., Kuang, S. Y., Liu, Y., ... 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.
- Zhineng, Y., Ying, M., Bingjie, T., Rouxian, Z. y Qiang, Z. (2021). Intestinal microbiota and functional characteristics of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). *Ann. Microbiol.*, *71*, 13.
- Zhou, Z., Yao, B., Romero, J., Waines, P., Ringø, E., Emery, M., ... y Merrifield, D. L. (2014). Methodological approaches used to assess fish gastrointestinal communities. *Aquaculture nutrition: Gut health, probiotics and prebiotics*, 101-127.
- Zhou, Z., Karlsen, Ø., He, S., Olsen, R. E., Yao, B. y Ringø, E. (2013). The effect of dietary chitin on the autochthonous gut bacteria of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*, *44*(12), 1889-1900.
- Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D., Akkermans-van Vliet, W. M., de Visser, J. A. G., y de Vos, W. M. (2001). The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbial ecology in health and disease*, *13*(3), 129-134.