



Universidad de Concepción
Dirección de Posgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias con Mención en Microbiología

**MICROBIOTA EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO:
EVALUACIÓN DEL ROL DE LA COMUNIDAD
MICROBIANA EN PECES DE CULTIVO Y SU RELACIÓN
CON LA SALUD DURANTE EL CICLO PRODUCTIVO**

Tesis para optar al Grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Microbiología

MARÍA FERNANDA MORALES RIVERA
CONCEPCIÓN-CHILE
2022

Profesor guía: Dr. Cristian Gallardo Escárate
Depto. Oceanografía. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores Integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Cristian Gallardo Escárate

Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Dr. Gerardo González Rocha

Profesor co-Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Valentina Valenzuela

Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR)
Universidad de Concepción

Dra. Celia Fernandes de Lima

Facultad de Odontología
Universidad de Concepción

Dr. Jorge Olivares

Profesor Evaluador Externo
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

Dr. Víctor Campos A.

Director de Programa Doctorado en Ciencias, con Mención
en Microbiología
Universidad de Concepción

Tesis financiada por
Centro INCAR, FONDECYT FONDAP (1522A0004)
FONDECYT FONDAP (15110027)
FONDECYT Iniciación 2022 (11220307)
FONDECYT Regular 2021 (1210852)
FONDECYT Postdoctorado 2020 (3200600)
FONDECYT Postdoctorado 2019 (3190320)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco toda la familia LBGA que me acogió con cariño desde el primer día. A sus palabras de aliento, apoyo y a sus consejos. Cada uno ha llenado mi corazón de una u otra forma. Un especial agradecimiento a Valentina, Diego y a Cristian que me brindaron todas las herramientas para el desarrollo de esta tesis.

Dedicado a mis hijas Renata y Claudia que han llenado de alegría mi vida. A Gustavo, que se ha dedicado al cuidado de nuestras hijas para que pudiera finalizar este proceso. No puedo olvidar a mis suegros, que han cuidado de las pequeñas cuando sus padres no han podido. A Mariana Dominguez, Helia Bello y Gerardo González que han sido luz en los momentos más difíciles.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
RESUMEN	12
ABSTRACT.....	15
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	18
CAPITULO II: ANTECEDENTES GENERALES	22
II.I. ACUICULTURA A NIVEL MUNDIAL Y SU RELEVANCIA EN CHILE.....	22
II. II. CICLO PRODUCTIVO DE SALMÓNIDOS Y SISTEMAS DE ACUICULTURA.....	23
II.III. ALTERACIÓN DEL MICROBIOMA Y ENFERMEDADES BACTERIANAS	26
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICO	31
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVO GENERAL	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
CAPÍTULO IV: IDENTIFICACIÓN DE <i>ALIIVIBRIO WODANIS</i> EN <i>SALMO SALAR</i> COMO PATÓGENO INVOLUCRADO EN UN BROTE EPIDÉMICO DESCONOCIDO EN SISTEMA DE RECIRCULACIÓN ACUÍCOLA (RAS) DE AGUA DULCE EN CHILE UTILIZANDO TECNOLOGÍA NANOPORE.....	32
RESUMEN	33
ABSTRACT.....	34
INTRODUCCIÓN	35
METODOLOGÍA.....	39
RESULTADOS.....	45
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	64
REFERENCIAS.....	65
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	78

CAPITULO V: ATLANTIC SALMON (*SALMO SALAR*) TRANSFER TO SEAWATER BY GRADUAL SALINITY CHANGES EXHIBITED AN INCREASE IN THE INTESTINAL MICROBIAL ABUNDANCE AND RICHNESS..... 86

ABSTRACT.....	86
1. INTRODUCTION	87
2. MATERIALS AND METHODS	90
3. RESULTS	94
4. DISCUSSION.....	103
5. CONCLUSIONS	109
REFERENCES.....	111
SUPPLEMENTARY MATERIALS.....	116
ANEXO CAPÍTULO V	122

CAPÍTULO VI: NANOPORE SEQUENCING EVIDENCED THE PRESENCE OF FISH BACTERIAL PATHOGENS IN THE SEA LOUSE (*CALIGUS ROGERCRESSEYI*) MICROBIOTA COLLECTED FROM DISTANT SALMON FARMS IN CHILE 125

ABSTRACT.....	125
INTRODUCTION.....	126
MATERIALS AND METHODS.....	129
RESULTS	133
DISCUSSION	139
REFERENCES.....	144
SUPPORTING INFORMATION	152

CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN GENERAL 156

CONCLUSIONES	167
PROYECCIONES	168
REFERENCIAS GENERALES	169

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO II

Figura 1. Ciclo Productivo del salmón del Atlántico..... 25

Figura 2. Microorganismos patógenos en centros de agua dulce en Chile. 28

Figura 3. Microorganismos patógenos en centros de agua dulce en Chile. 29

CAPITULO IV

Figura 1. Antecedentes preliminares del estado de salud de los peces. 40

Figura 2. Análisis de los datos obtenidos de las muestras de RAS..... 46

Figura 3. Abundancia relativa de la composición de la microbiota del RAS. 49

Figura 4. Análisis funcional del metagenoma microbiano de las muestras de intestino de salmón del Atlántico en RAS de agua dulce. 51

Figura 5. Análisis funcional del metagenoma microbiano de las muestras de agua de RAS agua dulce utilizado para el cultivo de salmón del Atlántico. 52

Figura 6. Análisis funcional del metagenoma microbiano de las muestras de agua de RAS agua dulce utilizado para el cultivo de salmón del Atlántico. 54

Figure 7. Análisis funcional del metagenoma microbiano del metabolismo de compuestos inorgánicos de las muestras de intestino de salmón del Atlántico en RAS agua dulce. 56

Figura S1. Relative abundance of microbiota composition of RAS system. 79

Figura S2. Functional analysis of the microbial metagenome of water samples. PICRUST2 inferred metabolic MetaCyc pathway (sec level) with an abundance relative filter of 0.5. 80

Figura S3A. KEGG pathway map of sulfur and nitrogen metabolism. 81

Figura S3B. KEGG pathway map of sulfur and nitrogen metabolism.	82
Figura S3C. KEGG pathway map of sulfur and nitrogen metabolism.	83
Figura A1. KOs (KEGG Orthology) de factores de virulencia que forman parte de la microbiota de RAS inferido por PICRUS2.	85

CAPITULO V

Figure 1. Diversity index of Atlantic Salmon intestinal microbiota between salinity treatments.	96
Figure 2. Relative abundance of intestinal Atlantic Salmon microbiota composition.	97
Figure 3. Heat map of normalized relative abundances of the Atlantic salmon intestine core microbiota among all experimental groups.	99
Figure 4. Relative abundance of intestinal Atlantic Salmon microbiota composition at the genus level in	101
Figure 5. Relative abundance proportion of metabolic pathway (level 2).	102
Figure S1. Experimental design.	116
Figure S2. Localization of chloride cells in the gill filament epithelium.	117
Figure S3. RT-qPCR analysis of ATPase- α and ATPase- β subunits.	117
Figure S4. Rarefaction curve.	118
Figure S5. Mock community composition.	118
Figura A1. Evaluación de Crecimiento de peces sometidos a diferentes tratamientos de salinidad durante el proceso de transferencia de agua dulce a agua de mar.	124

CAPITULO VI

Figure 1. A) Map of southern Chile, indicating Los Lagos (red), Aysen (green) and Magallanes (blue) regions. The numbers represent the sampled zones where sea lice were collected and the pie chart the relative abundance of 16S rRNA reads belonging to pathogenic bacteria found for each zone. B) Aquaculture productivity (tons) reported by SERNAPESCA between 2012 to 2017, in Los Lagos, Aysen and Magallanes regions. Available at (<http://www.sernapesca.cl/informes/estadisticas>).
..... 134

Figure 2. Pathogen biodiversity index estimated for the different sampled zones, including Simpson's, Shannon and Evenness index in Los Lagos (red), Aysen (green) and Magallanes (blue) regions..... 135

Figure 3. Heatmap with the relative abundance of 16S rRNA reads identified for different fish pathogens by the sampled zones in Los Lagos (1-4), Aysen (5 and 6) and Magallanes (7) regions. Color scale ranged from yellow to red and white boxes represents absence of reads for that particular pathogen in the different zones. 137

Figure 4. Phylogenetic tree constructed with the full 16S rRNA gene sequence for the 30 different fish pathogenic bacteria found in sea lice among all the sampled points..... 138

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO IV

Tabla S1. List of fish pathogens (Austin and Austin ,2016).....	78
Tabla S2. Sequencing data.....	79
Tabla S3. Complete taxa list of reads on RAS.....	79
Tabla S4. Functional prediction of microbiome in RAS.....	80
Tabla S5. Functional prediction of microbiome in RAS KEGG terms.....	80
Tabla A1. Tabla de abundancia KOs (KEGG Orthology) totales y KOs de virulencia,	84

CAPÍTULO V

Table S1: Sequencing data report	119
Table S2: Complete NanoCLUST classification cluster.	119
Table S3: Bray-Curtis similarities for intestine samples calculated on R with Vegan Package.	119
Table S4. NanoCLUST average percent identity of Clusters at the species level.	120
Table S5: Complete metabolic MetaCyc pathway relative abundance of freshwater (FW) and different seawater treatment inferred by PICRUS2.....	121
Tabla A1. Evaluación de Crecimiento de peces sometidos a diferentes tratamientos de salinidad durante el proceso de transferencia de agua dulce a agua de mar.	122
Tabla A2. Análisis de ANOVA de 2 vías con prueba de Tukey para evaluar el crecimiento de peces sometidos a diferentes tratamientos de salinidad durante el proceso de transferencia de agua dulce a agua de mar.	123

CAPÍTULO VI

Table 1. Nanopore MinION full-16S rRNA throughput by region and sampled zones.	133
Table 2: Number of pathogens in the database (Austin, 2016), identified pathogens, reads, mean length and accuracy for the 16S rRNA reads annotated from <i>Caligus rogercresseyi</i>	136
Tabla S1. List of fish pathogens (Austin, 2016).....	152

RESUMEN

Existe una creciente preocupación en garantizar el bienestar animal en la acuicultura. A tal efecto, la microbiota intestinal es un campo prometedor para evaluar y mejorar este bienestar. Lo anterior debido a que posee una gran relevancia en el hospedero influenciando, por ejemplo, el sistema digestivo e inmune. En ese sentido, además de la taxonomía, ha crecido el interés por conocer la funcionalidad metabólica de las comunidades microbianas, debido a que ofrece ventajas al momento de evaluar el efecto sobre los cambios en el entorno. El objetivo de esta tesis fue establecer si la estructura taxonómica y funcional de la comunidad microbiana en salmón del Atlántico brinda herramientas para evaluar el bienestar animal durante el proceso productivo. Para este trabajo, se utilizó la secuenciación de la región V1-V9 del gen del ARNr 16S mediante Nanopore MinION. Posterior a ello, la asignaciones taxonómicas se realizaron mediante la plataforma “Epi2Me de Oxford Nanopore” o por la herramienta “NanoCLUST”. Además, para el cálculo de diversidad taxonómica se utilizó el paquete “Vegan” en el programa “R studio”, con el cual se calculó la diversidad alfa y la estimación de uniformidad por el índice de Pielou. La estructura de la comunidad microbiana se analizó utilizando Bray-Curtis con un análisis de coordenadas principales (PCoA). Por último, la predicción funcional del metagenoma se realizó mediante PICRUSt2 utilizando la bases de datos MetaCyc. Para el primer análisis, se determinó la taxonomía de muestras de intestino de salmón del Atlántico con distención abdominal (DA), sin distención abdominal (no_DA) y muestras de agua de la Bocatoma (Boca), decantador (Deca), entradas y salidas del biofiltro (BF) de un sistema de recirculación acuícola (RAS) de agua dulce. Esto para identificar la

microbiota en peces afectados y enfermos durante un brote epidémico posterior a un evento de vacunación. Las muestras de intestino de los peces con (DA) fueron las que menores índices de diversidad presentaron, junto con una dominancia de *Proteobacteria*. Además, *Aliivibrio wodanis* es el principal patógeno presente en los peces con DA y un probable agente etiológico de los peces enfermos. Por otro lado, la microbiota de los peces no_DA poseen una mayor contribución en los *pathway* relacionados con metabolismo de aminoácidos y fermentación de ácidos grasos de cadena corta, lo que es indicativo de una mejor salud con respecto a los peces con DA. Adicionalmente, se determinó la contribución al metabolismo de compuestos inorgánicos utilizando la base de datos de “KEGG Orthology” para la construcción de mapas metabólicos con la herramienta “KEGG Mapper” enfocados en el metabolismo del nitrógeno y sulfuro. Como resultado, encontramos que el metabolismo del sulfuro es el más representado en peces DA. Además, los procesos de desnitrificación y nitrificación se encuentran favorecidos en la muestra de agua Deca, por sobre las otras, lo que tiene estrecha relación con el rol que posee. Posterior a esto, se evaluó la taxonomía de *smolts* durante su transferencia al agua de mar bajo diferentes tratamientos y se analizó la metagenómica funcional de la microbiota del intestino de los peces. Esto incluyó un grupo de muestreo sometido a la alimentación mediante una dieta funcional (FD) previo al proceso de transferencia al agua de mar. Todo lo anterior, con el objetivo de evaluar si un cambio gradual en la salinidad (GSC) previo a la transferencia de agua de mar favorece la diversidad de la microbiota por sobre un shock osmótico (SS). Como resultado, encontramos que la riqueza y diversidad microbiana fueron mayores en los peces sometidos a GSC, lo que sugiere una asociación positiva entre la

comunidad microbiana y la salud de los peces. Además, se hacen presentes bacterias del género *Vibrio* en las muestras de intestino de los peces en agua de mar que no estaban presentes en agua dulce ni durante el GSC. Además, los peces alimentados con FD previo a un choque salino, presentan menos abundancia de este género. En cuanto a la funcionalidad metabólica, la biosíntesis de aminoácidos como valina, leucina e isoleucina se encuentran favorecidos en los peces previamente alimentados con FD. Por otro lado, la degradación de aminoácidos esenciales está favorecida en los peces alimentados con FD y en los sometidos a un SS. Por otro lado, la degradación de drogas, contaminantes y otros compuestos aromáticos se encuentran favorecidos en los peces alimentados con FD y en los peces sometidos GSC. Para finalizar, se estudió la microbiota de *Caligus rogercresseyi* de diferentes zonas del sur de Chile, como potencial reservorio de patógenos que pueden afectar al salmón del Atlántico. Para ello, de los resultados taxonómicos, se filtraron aquellos que corresponden a bacterias patógenas de peces y se determinaron los índices de diversidad. Se identificaron patógenos pertenecientes al género *Tenacibaculum*. Adicionalmente, la abundancia y diversidad de patógenos está directamente relacionada con la biomasa de salmón producida en cada una de las zonas. En resumen, el conocimiento de la estructura taxonómica y funcional de la microbiota del intestino nos permite evaluar que peces poseen un mejor estado de salud con respecto a otros. Brindándonos una herramienta para reconocer signos de enfermedad. Además, nos permite evaluar la calidad microbiológica del agua y nos brinda información sobre la microbiota de patógenos potenciales totales, tanto en el agua como en otros parásitos como *C. rogercresseyi*.

ABSTRACT

There is a growing concern to ensure this animal welfare in aquaculture. To this effect, intestinal microbiota is a promising field to evaluate and improve welfare. This is because it has great relevance in the host influencing, for example, the digestive and immune systems. In this sense, in addition to taxonomy, there has been a growing interest in knowing the metabolic functionality of microbial communities, because it offers advantages when evaluating the effect of changes in the environment. The objective of this thesis was to establish whether the taxonomic and functional structure of the microbial community in Atlantic salmon provides us with tools to evaluate animal welfare during the production process. For this work, the sequencing of the V1-V9 16S rRNA region using Nanopore MinION was used. Subsequently, taxonomic assignments were made using the "Epi2Me de Oxford Nanopore" platform or the "NanoCLUST" tool. In addition, the "Vegan" package in the "R studio" program was used to calculate the alpha diversity and the estimation of uniformity by the Pielou index. The microbial community structure was analyzed using Bray-Curtis with a principal coordinates analysis (PCoA). Finally, functional prediction of the metagenome was performed by PICRUSt2 using the MetaCyc database. For the first analysis, the taxonomy of gut samples from Atlantic salmon with abdominal distension (AD), without abdominal distension (no_AD) and water samples from the intake (Mouth), decanter (Deca), inlets and outlets of the biofilter (BF) of a freshwater aquaculture recirculation system (RAS) was determined. This was to identify the microbiota in affected and diseased fish during an epidemic outbreak following a vaccination event. Gut samples from fish with (DA) yielded the lowest diversity indices, along with a dominance of *Proteobacteria*. In addition,

Aliivibrio wodanis is the main pathogen present in DA fish and a probable etiological agent of diseased fish. On the other hand, the microbiota of non-AD fish have a higher contribution in pathways related to amino acid metabolism and short-chain fatty acid fermentation, which is indicative of better health compared to AD fish. Additionally, the contribution to the metabolism of inorganic compounds was determined using the "KEGG Orthology" database for the construction of metabolic maps with the "KEGG Mapper" tool focused on nitrogen and sulfur metabolism. As a result, we found that sulfide metabolism is the most represented in DA weights. In addition, denitrification and nitrification processes are found to be favored in the DECA water sample over the others. This is closely related to the role it plays. Subsequently, the taxonomy of smolts during their transfer to seawater under different treatments was evaluated and, the functional metagenomics of the gut microbiota of the fish was analyzed. This included a sampling group subjected to feeding with a functional diet (FD) prior to the transfer process to seawater. The objective was to evaluate whether a gradual change in salinity (GSC) prior to seawater transfer favors microbiota diversity over an osmotic shock (SS). As a result, we found that microbial richness and diversity were higher in fish subjected to GSC, suggesting a positive association between microbial community and fish health. In addition, bacteria of the genus *Vibrio* are present in the gut samples of fish in seawater that were not present in freshwater or during GSC. In addition, fish feeding with a FD prior to salt shock show less abundance of this genus. In terms of metabolic functionality, the biosynthesis of amino acids such as valine, leucine and isoleucine are found to be favored in fish previously feeding with a FD. On the other hand, the degradation of essential amino acids is favored feeding with a FD and SS

fish. On the other hand, the degradation of drugs, contaminants and other aromatic compounds is favored in FD-fed fish and in fish subjected to GSC. Finally, the microbiota of *Caligus rogercresseyi* from different areas of southern Chile was studied as a potential reservoir of pathogens that can affect Atlantic salmon. For this purpose, from the taxonomic results, those that correspond to fish pathogenic bacteria were filtered and the diversity indexes were determined. As a result, pathogens belonging to the genus *Tenacibaculum* were identified. Additionally, the abundance and diversity of pathogens is directly related to the biomass of salmon produced in each of the zones. In summary, knowledge of the taxonomic and functional structure of the gut microbiota allows us to evaluate which fish are healthier than others. This provides us with a tool to recognize signs of disease. It also allows us to evaluate the microbiological quality of the water and provides us with information on the microbiota of potential total pathogens, both in the water and in other parasites such as *Caligus rogercresseyi*.

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

A grandes rasgos el bienestar animal está definido como “el estado del individuo con respecto a los intentos de hacer frente a su entorno” (Segner et al., 2019). En ese sentido, la salud y el bienestar de los animales son una preocupación cada vez mayor en el mundo (Segner et al., 2019). Esto probablemente atribuido a que hoy en día existe una gran demanda de productos pesqueros (FAO, 2022c (FAO, 2022b). Es por ello por lo que la acuicultura se ha transformado en una fuente importante de proteína para consumo humano (Ahmad et al., 2021; Bouelet Ntsama et al., 2018). Por ende, esta industria se ha transformado en la de mayor crecimiento y una importante fuente de empleo a nivel mundial (Ahmad et al., 2021; FAO, 2022b). Por otro lado, se ha enfrentado al desafío de desarrollar sistemas sustentables que lidien con el impacto ambiental, destrucción de hábitat, la disponibilidad de agua, transmisión de enfermedades, entre otros (Ahmed & Turchini, 2021; Minich et al., 2020; Schreier et al., 2010). Es por ello que la salud animal es la base para la acuicultura sustentable (Tlusty, 2020). Esto no solo para la sostenibilidad de la producción, sino también para reducir el impacto ambiental que conlleva. Las enfermedades infecciosas son una de las grandes limitantes en la industria de la acuicultura y se cree que continuarán siéndolo a pesar de los avances tecnológicos (Jennings et al., 2016). Sin embargo, la mortalidad animal es un indicativo de disminución del bienestar del animal (Ellis et al., 2012).

El salmón del Atlántico es una de las principales especies cultivadas en Chile y en el mundo (FAO, 2022a; Sernapesca, 2021a). En ese sentido, los progresos en el estudio de enfermedades en salmón del Atlántico son significativamente mayor

que en otras especies cultivadas (Stentiford et al., 2017). El cultivo de esta especie se basa en el ciclo de vida salvaje. En donde el primer paso es la producción de reproductores y huevos, seguido de la producción de alevines, producción de smolts y producción o engorde de peces (Asche & Bjørndal, 2011). En todo este ciclo, la homeostasis de las comunidades de los microorganismos es esencial para el sistema inmunológico y, por lo tanto, para la salud de los peces (Milligan-Myhre et al., 2016). Una alteración del nicho contribuye a la alteración de las composiciones de la comunidad (Dehler et al., 2017; Llewellyn et al., 2016; Milligan-Myhre et al., 2016; Wang et al., 2021). Estas alteraciones afectan la integridad intestinal, lo que implica riesgos de colonización por microorganismos patógenos (Bjørngen et al., 2020; Løkka & Koppang, 2016). En ese aspecto, la microbiota intestinal se considera como un órgano olvidado, a pesar de que tiene gran implicancia en la salud del hospedador. En particular, a lo relacionado a la respuesta inmune, neural y endocrina (Chen et al., 2021).

Por otro lado, múltiples sistemas de cultivo existen en la actualidad, cada uno de ellos ha ido avanzado en la medida de que la tecnología lo hace. Uno de ellos, sistema de recirculación acuícola (RAS, acrónimo en inglés de “Recirculating Aquaculture Systems”). En general, los microorganismos juegan un papel clave para el funcionamiento de los ecosistemas (Azam & Malfatti, 2007). Es por ello que el estudio de la comunidad microbiana en un RAS es importante para establecer que procesos determinan su desarrollo y cual es la interacción que tienen con los peces (Blancheton et al., 2013). Las herramientas de secuenciación han permitido conocer la diversidad de microorganismos presentes en los sistemas de acuicultura con mayor amplitud. Además, los microorganismos son capaces de proveer nutrientes

esenciales o mejorar la resiliencia del hospedador a los patógenos (Egan et al., 2013; Heintz-Buschart & Wilmes, 2018). En ese sentido, evaluar la funcionalidad de la comunidad microbiana es igual de importante que la taxonomía y filogenia (Birrer et al., 2019). Más aun, la predicción del potencial funcional de la comunidad microbiana ha reportado utilidad en evaluar los efectos de los cambios ambientales en la comunidad microbiana o nichos microbianos específicos (Laroche et al., 2021). La información funcional y taxonómica nos permite conocer la redundancia funcional dentro la comunidad (Escalas et al., 2019). En ese sentido, hay poca información sobre el potencial genómico funcional de la comunidad microbiana en salmón del Atlántico. Solo algunos trabajos exploran metagenoma microbiano a nivel funcional (Dehler et al., 2017; Kobiyama et al., 2018; Lorgen-Ritchie et al., 2021). Sin embargo, estos trabajos solo indagan las vías principales, sin aprovechar las capacidad informativa de los datos. Sumado a ello, existen discrepancias en la composición de la comunidad microbiana en salmón del Atlántico (Dehler et al., 2017; Huyben et al., 2020; Li et al., 2021; Lorgen-Ritchie et al., 2021). Esto debido a que son múltiples los factores que modelan la comunidad. Por lo que se hace necesario el estudio de la comunidad microbiana local. Por otro lado, ectoparásitos como *Caligus rogercresseyi* podrían estar actuando como vectores biológicos de bacterias patógenas (Gonçalves et al., 2020). Sin embargo, la comunidad patogénica por región no ha sido explorada explícitamente.

En este trabajo se enfoca en establecer si la estructura taxonómica y metagenómica funcional de la comunidad microbiana del intestino de salmón del Atlántico y el entorno biológico es indicador de una mejor salud en los peces durante la producción de smolts desde agua dulce a agua salada. Para ello, exploramos el

uso de tecnologías de secuenciación de tercera generación para estudiar la composición taxonómica y la metagenómica funcional de la microbiota del intestino de salmón del Atlántico y muestras de agua de un sistema RAS de agua dulce. Esto para identificar agentes etiológicos en peces afectados y enfermos durante un brote epidémico posterior a un evento de vacunación. En dicho evento, no pudo identificarse el agente etiológico mediante pruebas de PCR tradicionales contra microorganismos endémicamente sospechosos. Posterior a ello, se estudio la taxonomía de smolts durante su transferencia al agua de mar bajo diferentes tratamientos y se analizó la metagenómica funcional de la microbiota del intestino de los peces. Esto con el objetivo de evaluar si un cambio gradual en la salinidad previo a la transferencia de agua de mar favorece la diversidad de la microbiota. Para finalizar, se estudió a *C. rogercresseyi* como potencial reservorio de patógenos que pueden afectar al Salmón del Atlántico en su periodo de engorda en jaulas.

CAPITULO II: ANTECEDENTES GENERALES

II.I. Acuicultura a nivel mundial y su relevancia en Chile

La acuicultura se refiere al cultivo de organismos acuáticos, incluidos peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas, en entornos seleccionados o controlados (Bouelet Ntsama et al., 2018). Distinguiéndolo de la pesca de captura en la propiedad del stock y la intervención deliberada en el ciclo de producción (Naylor et al., 2021). Hoy, la acuicultura, desempeña un papel fundamental en el sistema alimentario mundial (Ahmad et al., 2021). Chile no es la excepción; las toneladas producidas en acuicultura equivalen al 41% en comparación a la pesca de captura, con un crecimiento sostenido a través del tiempo (FAO, 2022b). En dólares, las exportaciones ascienden a 5900 millones USD, representando el 3,9% a nivel mundial. Mundialmente, más de 300 especies son cultivadas entre algas, peces, crustáceos, mariscos, entre otros (FAO, 2022b). Sin embargo, son solo 4 grupos de productos pesqueros derivados de la acuicultura que predominan en Chile. Pese a la poca diversidad, Chile ocupa el cuarto exportador de productos acuáticos de nivel mundial. Entre los productos pesqueros más explotados destaca el cultivo de salmónidos (FAO, 2022b). El cual fluctúa en un promedio de 71,8% entre 2010 y 2020. La industria de la salmonicultura, en especial el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) se ha convertido en una de las industrias más rentables y tecnológicamente más avanzadas (FAO, 2022b). Además, se ha evaluado que el salmón del Atlántico está dentro de los primeros quintiles en términos de calidad nutricional y menor

impacto ambiental (Hallström et al., 2019). Lo que lo hacen un producto muy apreciado. En Chile, la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y salmón del Atlántico son los salmónidos más cultivados. Sin embargo, salmón del Atlántico ha ido ganando cada vez más terreno, alcanzando el 2020 más del 72% de salmónidos cultivados en dicho periodo (FAO, 2022b; Sernapesca, 2021b). Las regiones con mayor producción en etapa de engorda de salmón del Atlántico es Aysén, con una producción por sobre las 350.000 toneladas. Seguida muy por debajo por la región de los Lagos y la región de Magallanes (Sernapesca, 2021a). Esto convierte a la región de Aysén en un punto importante de estudio de impacto ambiental. Por un lado, es la región que registra mayor consumo de antibióticos (Sernapesca, 2021c). Por otro lado, es la región que mayores problemas parasitarios posee con *C. rogercresseyi* (Sernapesca, 2021b). Cuya relación con la comunidad microbiana se discutirá más adelante.

II. II. Ciclo productivo de salmónidos y sistemas de acuicultura

Para el proceso de producción de salmónidos, se han diseñado sistemas de acuicultura con variadas características que se han ido adaptando a medida de los avances tecnológicos. Estos están basados en el tipo de estructura, sistema de agua de recambio, intensidad de cultivo, cantidad de cultivos, entre otros (Ahmad et al., 2021). Estas estructuras pueden variar entre estanques, jaulas y tanques. Las que pueden contar con sistemas de recambio de agua estático, abierto o sistemas

cerrados, como por ejemplo los sistemas de recirculación acuícola (RAS acrónimo en inglés) (Ahmad et al., 2021).

En el cultivo de salmónidos, los productores intentan imitar el ciclo natural (Asche & Bjørndal, 2011). Los salmones anádromos en su entorno natural atraviesan un proceso en el cual los salmones juveniles pasan su tiempo en agua del río para después migrar y crecer en agua de mar (Jonsson & Jonsson, 2009). Siguiendo esa misma línea, el proceso productivo del salmón parte desde el desove, fertilización e incubación en agua dulce oxigenada, para luego atravesar por el alevinaje, la esmoltificación, engorda en agua de mar y finalmente, la cosecha y procesamiento de los salmones adultos (Asche & Bjørndal, 2011; Santurtun et al., 2018) (Figura 1). Dentro de las etapas del ciclo productivo, la esmoltificación es un proceso en el cual los parr maduros (de aproximadamente 16 meses de crecimiento) atraviesan por un proceso fisiológico para adaptarse al agua de mar (Asche & Bjørndal, 2011; Jonsson & Jonsson, 2009). En los peces de cultivo, este proceso se puede modular a través de condiciones de temperatura y fotoperiodo controladas (Hines et al., 2019; Strand et al., 2018). Luego de eso, los smolts son trasladados al agua de Mar. Durante el proceso de esmoltificación, el salmón del Atlántico requiere de cambios moleculares y fisiológicos que permiten la transformación parr-smolt. (Nisembaum et al., 2021; Sundh et al., 2014). Los movimientos entre agua dulce y agua de mar requieren ajustes fisiológicos importantes en relación con la presión osmótica cambiante (Nisembaum et al., 2021). Se debe establecer un balance electrolítico durante la transición entre FW a SW, donde el intestino juega un papel fundamental Sundh et al. (2014). En los peces de cultivo, este proceso se puede modular a través de condiciones de temperatura y fotoperiodo controladas (Hines

et al.; Strand et al.). Luego de eso, los smolts son trasladados al agua de Mar. La alteración provocada por el cultivo puede afectar la salud y la integridad intestinal en el salmón (Løkka & Koppang, 2016). Generando un impacto en la microbiota intestinal (Bjørngen et al., 2020). Los patógenos pueden aprovechar ese desbalance para ingresar al huésped.



Figura 1. Ciclo Productivo del salmón del Atlántico. Basado en la información de Asche and Bjørndal (2011) y SalmonChile (2021). En negrita destacan los procesos tratados en este trabajo.

En cuanto a los sistemas de producción, uno de los métodos de producción más populares en agua dulce para la producción de ovas hasta parr de salmones, son los sistemas RAS. Sin embargo, los ciclos completos de producción de salmón en RAS terrestres son cada vez más comunes (Fossmark et al., 2021; Minich et al., 2020; Moschos et al., 2022). En Chile, los sistemas de recirculación acuícola se utilizan principalmente para la producción de alevines y esmoltificación, para luego

hacer el traspaso a jaulas en el mar. Los RAS son sistemas intensivos cerrados de monocultivo en tanques que han prometido superar limitaciones de los sistemas convencionales, tanto en sistemas de agua dulce como en agua salada (Ahmad et al., 2021; Ahmed & Thompson, 2019; Schreier et al., 2010). En teoría, en los sistemas RAS el agua que se pierde es principalmente producto de la evaporación e infiltración, por lo que es posible reciclar hasta el 99% (Ahmed & Turchini, 2021; Schreier et al., 2010). Los sistemas RAS permiten controlar y mejorar parámetros que en los sistemas de flujo no es posible (d'Orbcastel et al., 2009; Minich et al., 2020). Además, permite medir la implementación de técnicas y parámetros para su mejora, reducción del impacto ambiental y adaptación al cambio climático (Ahmed & Turchini, 2021; Bauer et al., 2021; Yogev & Gross, 2019).

II.III. Alteración del microbioma y enfermedades bacterianas

Múltiples son los factores que podrían alterar la microbiota de los peces. Se ha observado que los cambios en la comunidad microbiana generan una supresión inmunitaria asociada a la transferencia a agua de mar y al proceso de esmoltificación en salmón del Atlántico, que podría ser un factor de riesgo en la adquisición de enfermedades infecciosas (Johansson et al., 2016). Por otro lado, los cambios de salinidad tienen implicancia en el crecimiento del Salmón del Atlántico (Bœuf & Payan). Por ejemplo, se ha estudiado que variaciones en la salinidad pueden aumentar o disminuir la presencia de bacterias potencialmente patógenas. Bauer et al. (Bauer et al., 2021) determinó que para el cultivo de

Litopenaeus vannamei en RAS, disminuir la salinidad aumentan los riesgos de aparición de bacterias del género *Vibrio*, en particular *V. parahaemolyticus*, *V. owensii* y *V. campbellii*. También, cambios alimenticios como diferencias en la proporción de lípidos en la dieta alteran la microbiota intestinal (Huyben et al., 2020). Sin embargo, ciertas barreras deben ser atravesadas para completar ese proceso. En el intestino, los microorganismos ambientales deben ser capaces de superar las defensas del huésped para colonizar los nichos disponibles (Schmidt et al., 2015).

Las enfermedades en acuicultura son una limitantes en la industria (Jennings et al., 2016). En donde la mortalidad esta asociada a un bienestar animal deficiente (Oliveira et al., 2021). En Chile, los porcentajes de mortalidad varían entre 0,55 y 1,05%, de las cuales el 23,3% corresponde a enfermedades infecciosas (Sernapesca, 2021b). En general, esta mortalidad es, a menudo, causada por la presencia de uno o más patógenos. Sin embargo, factores ambientales y de los peces también son relevantes (Oliveira et al., 2021). En Chile, los eventos de mortalidad masiva entre junio y noviembre corresponden en un 56% a causas ambientales, sin embargo un 32% corresponde a causas sanitarias o una combinación de causas sanitarias y ambientales (Sernapesca, 2020). En general, cualquier evento que genere un desbalance en la microbiota puede generar la aparición de patógenos oportunistas que ya estén formando parte de la microbiota afectada (Rud et al., 2017).

Las bacterias potencialmente patógenas que han sido encontradas en RAS de agua dulce pertenecen a los géneros *Vibrio*, *Erwinia*, *Coxiella*, *Aeromonas*, entre otros (Schmidt et al., 2016; Schreier et al., 2010). Por otro lado, en Chile, según los registros de mortalidad y vigilancia epidemiológica, en los criaderos de agua dulce,

la principal bacteria responsable de brotes epidémicos pertenece al género *Flavobacterium*, tanto en el registro de mortalidad como en los reportes de vigilancia (Figura 2). *Flavobacterium psychrophilum* es considerado el principal responsable de enfermedades en la salmicultura de agua dulce en Chile (Miranda et al., 2021). En los reportes de vigilancia epidemiológica, precisamente predomina *F. psychrophilum*, reportándose en varias regiones del país, seguida muy por debajo por *Flavobacterium columnare* (Figura 2B).

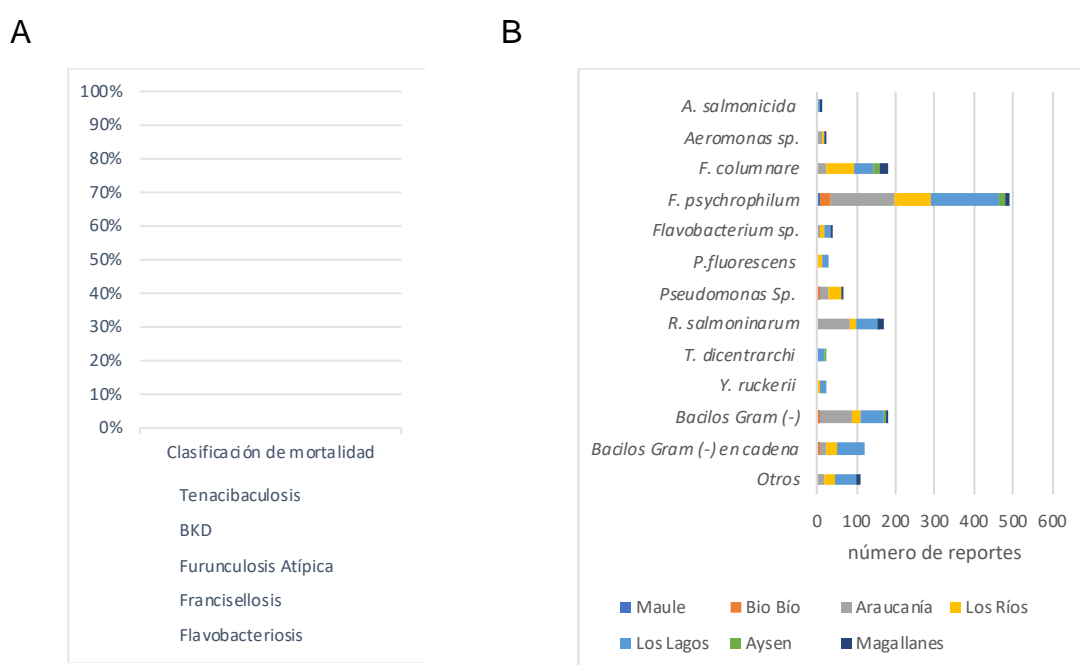


Figura 2. Microorganismos patógenos en centros de agua dulce en Chile. **A.** Reporte sanitario de *S. salar* en centros de agua de dulce 2021. **B.** Reporte de vigilancia de agentes endémicos focalizado en patógenos bacterianos. Fuente Sernapesca (2021b).

Mientras que en los RAS y sistemas semi-cerrados de agua salada, se ha informado la presencia de los géneros *Moritella*, *Tenacibaculum*, *Aliivibrio*, *Psychrobacter*, *Francisella*, *Flavobacterium*, *Polaribacter*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas* y *Photobacterium* (Drønen et al., 2022; Rud et al.,

2017). En Chile, la mortalidad está asociada a la piscirickettsiosis (SRS; septicemia rickettsial salmonídea) provocada por *Piscirickettsia salmonis*, que es la principal causa de muerte por enfermedades infecciosas, seguida muy de cerca por la tenacibaculosis, causada por diversas especies de *Tenacibaculum* (Figura 3A). Sin embargo, en los informes de vigilancia, *Tenacibaculum dicentrarchi* es el más reportado en las regiones de Los Lagos y Aysén (Figura 3B), seguido por *Renibacterium salmoninarum*, que se reporta principalmente a las regiones de Aysén y Magallanes.

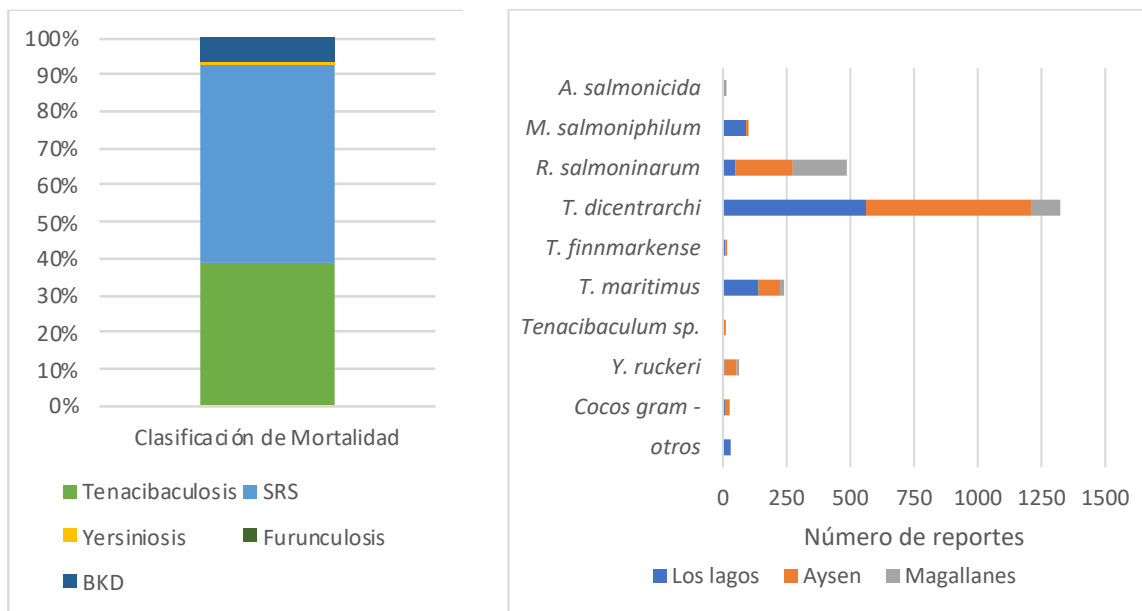


Figura 3. Microorganismos patógenos en centros de agua dulce en Chile. Reporte sanitario de *S. salar* en centros de agua de mar 2021 **A.** Distribución de clasificación de mortalidad asociada a enfermedades bacterianas **B.** Reporte de vigilancia de agentes endémicos focalizado en patógenos bacterianos. Fuente (Sernapesca, 2021b).

Por otro lado, el estudio del microbioma no sólo debería estar restringido al perteneciente a los peces. Los ectoparásitos que afectan a este también podrían actuar como vectores biológicos tanto de virus como de bacterias (Gonçalves et al.,

2020; Oelckers et al., 2014). *Caligus rogercresseyi* es un parásito externo dominante en Chile y afecta tanto a salmones como a truchas, provocando gran impacto sanitario y económico en los ambientes afectados (Gonzalez-Gomez et al., 2020; Lepe-López et al., 2021). Esto limita el desarrollo sustentable de la acuicultura en Chile (Valenzuela-Miranda et al., 2022). *Caligus rogercresseyi* posee un gran potencial reproductivo, incluso cuando se infectan peces con una baja abundancia inicial de parásitos (Gonzalez-Gomez et al., 2020). La caracterización de la comunidad microbiana ha sido recientemente representada (Gonçalves et al., 2020). En ella, *Proteobacterias* y *Bacteroidetes* poseen una fuerte presencia en el parásito. Además, bacterias de los géneros *Pseudoalteromonas* y *Dokdonia* son dominantes en las muestras. A ello se suma la presencia de géneros potencialmente patógenos como *Vibrio*, *Tenacibaculum* y *Aeromonas* (Gonçalves et al., 2020). Adicionalmente, gracias a reciente secuenciación del genoma de *C. rogercresseyi*, se han logrado obtener genomas bacterianos con una compleción mayor al 97%, de especies como *Tenacibaculum ovolyticum* (Valenzuela-Miranda et al., 2022). Sin embargo, la comunidad patogénica por región no ha sido explorada explícitamente.

CAPÍTULO III: HIPÓTESIS OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICO

HIPÓTESIS

El estudio taxonómico y funcional de la microbiota intestinal de el salmón Atlántico permite establecer las condiciones de salud a lo largo del proceso productivo.

La identificación de la microbiota del ectoparásito *Caligus rogercresseyi* permitiría identificar potenciales patógenos que afectaría el cultivo de el salmón Atlántico.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la microbiota asociada a salmón del Atlántico como indicador de salud mediante la caracterización taxonómica y funcional de las comunidades bacterianas en distintas etapas del ciclo productivo

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar el agente etiológico de una enfermedad de origen desconocido en salmones afectados en un sistema de recirculación acuícola (RAS) de agua dulce.
2. Determinar cambios estructurales y funcionales en la microbiota del salmón del Atlántico expuestos a distintos regímenes de salinidad durante la transición de agua dulce a agua de mar.
3. Identificar la microbiota del piojo de mar (*Caligus rogercresseyi*) que infecta a salmones del Atlántico y evaluar su relación con enfermedades bacterianas de peces.

CAPÍTULO IV: IDENTIFICACIÓN DE *Aliivibrio wodanis* EN *Salmo salar* COMO PATÓGENO INVOLUCRADO EN UN BROTE EPIDÉMICO DESCONOCIDO EN SISTEMA DE RECIRCULACIÓN ACUÍCOLA (RAS) DE AGUA DULCE EN CHILE UTILIZANDO TECNOLOGÍA NANOPORE.

Manuscrito en preparación para enviar a revista *Aquaculture*

María F. Morales-Rivera^{1,2,3}, Valentina Valenzuela-Muñoz^{1,2}, Bárbara P. Benavente^{1,2}, Gerardo González-Rocha³, Cristian Gallardo-Escárate^{1,2}, Enrique Madrid Soto and Diego Valenzuela-Miranda^{1,2*}.

¹Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), University of Concepción, P. O. Box 160-C, Concepción, Chile

²Laboratory of Biotechnology and Aquatic Genomics, Department of Oceanography, University of Concepción, Concepción, Chile.

³Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

**Corresponding author:*

Resumen

Los sistemas de recirculación acuícola (RAS) enfrentan diferentes desafíos asociados con el bienestar, la salud y el crecimiento de los peces. Entre ellos, brotes epidémicos. En este trabajo, exploramos el uso de tecnologías de secuenciación de 3^{ra} generación para estudiar la microbiota y la metagenómica funcional de un RAS de agua dulce, durante un brote epidémico con agente etiológico que no pudo identificarse mediante detección por PCR contra patógenos clínicamente sospechosos. Para ello, se recolectaron muestras del intestino de salmón del Atlántico con y sin distensión abdominal y muestras de agua (entrada, decantador, entrada al biofiltro y salida del biofiltro). El gen del ARNr 16S completo se secuenció en la plataforma Nanopore MinION para reconstruir la comunidad microbiana. Los resultados evidenciaron una disminución en la diversidad y predominio de *Proteobacteria* en peces con distensión abdominal. Además, en todas las muestras intestinales se encontraron patógenos de los géneros *Aeromonas*, *Aliivibrio* y *Vibrio*, entre otros, siendo *Aliivibrio wodanis* el agente más abundante en los peces con distensión abdominal. En cuanto al análisis funcional, el salmón sin distensión abdominal tiene una mayor contribución en las vías funcionales relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos y la fermentación de ácidos grasos de cadena corta, lo que es indicativo de una salud más favorable a la de los peces con distensión abdominal. Bacterias importantes para los procesos de desnitrificación fueron identificadas en las muestras de agua. Así como aquellas vías metabólicas relacionadas con el metabolismo del sulfuro de hidrógeno. Estos hallazgos demuestran la utilidad de los métodos de secuenciación de 3^{ra} generación para

evaluar la salud de los peces en RAS.

Abstract

Recirculating Aquaculture Systems (RAS) face different challenges associated with fish's welfare, health, and growth. For example, disease outbreaks. In this work, we explored the use of third-generation sequencing technologies to study the microbiota and functional metagenomics in a commercial freshwater RAS, showing evidence of a disease outbreak with an unknown etiologic agent that could not be identified by traditional PCR tests against clinically suspected pathogens. For that purpose, bloating and without bloating intestinal Atlantic salmon samples and water samples (intake, decanter, and intake and outlet biofilter) were collected. The full 16S rRNA gene was sequenced in Nanopore MinION platform to reconstruct the microbial community. The results evidenced a decrease in the microbial diversity and predominance of *Proteobacteria* in bloating fish. Furthermore, pathogens from the genus *Aeromonas*, *Aliivibrio*, and *Vibrio*, among others, were found in all intestinal samples. *Aliivibrio wodanis* being the most abundant in bloating fish. About functional contribution, salmon without bloating have a greater contribution in pathways related to amino acid metabolism and short-chain fatty acid fermentation, which is indicative of a more favorable health with respect to fish with bloating. Bacteria important for denitrification processes are also found in water samples. As well as those metabolic pathways related to the metabolism of hydrogen sulfide. These findings demonstrate the utility of third-generation sequencing methods for assessing the health of RAS.

Keywords: Atlantic Salmon, Recirculating Aquaculture Systems, disease

outbreak, Microbiome, Nanopore, functional prediction

Introducción

La industria de la acuicultura se ha enfrentado al desafío de desarrollar sistemas sustentables, en los cuales pueda lidiar con problemas de impacto ambiental, como la disponibilidad de agua, destrucción de hábitat, transmisión de parásitos, entre otros (Ahmed and Turchini, 2021; Minich, J. J. et al., 2020; Schreier et al., 2010).

Los sistemas de recirculación acuícola (RAS) han prometido superar limitaciones de los sistemas convencionales, tanto en sistemas de agua dulce como en agua salada (Schreier et al., 2010). En un sistema de recirculación, el entorno microbiológico es complejo, ya que cambia producto de la microbiota de los peces, la alimentación, los parámetros del agua de reposición, entre otros (Blancheton et al., 2013). Estudiar la composición bacteriana de los peces puede ser una estrategia para evaluar el riesgo de enfermedades infecciosas causadas por patógenos oportunistas en el RAS previo a un brote (Sergaliev et al., 2021). Además, el estudio y modulación del microbioma surge como un elemento para predecir y mejorar el estado de salud de los peces (Minich, J. J. et al., 2020; Vadstein et al., 2018).

Los sistemas RAS minimizan de forma efectiva el riesgo de enfermedades, ya que es posible establecer un mejor control biológico (Blancheton et al., 2013). Por un lado, los RAS son capaces de establecer una comunidad microbiana madura, por lo que los peces tienen menos probabilidades de desarrollar interacción

con microorganismos oportunistas (Attramadal et al., 2014). Sin embargo, garantizar esto es un desafío de bioseguridad. Al haber gran cantidad de población en pequeños espacios, es necesario prestar atención a las condiciones de salubridad puesto a que, ante un brote epidémico, todos los peces se infectarán rápidamente (Ahmed and Turchini, 2021). Brotes pueden ocurrir en ausencia de patógenos identificados, producto de la colonización excesiva o estrés ambiental (Blancheton et al., 2013). Una vez ocurrido los brotes epidémicos, el sucesivo tratamiento antibiótico puede causar la selección de bacterias resistentes dentro del sistema (Du et al., 2019). Las bacterias potencialmente patógenas que han sido encontradas en RAS pertenecen a los géneros *Vibrio*, *Erwinia*, *Coxiella*, *Aeromonas*, entre otras (Schreier et al., 2010).

Debido a que los entornos mucosos como branquias, piel e intestino son componentes críticos de respuesta inmunitaria, se transformaron en un punto de especial interés en el estudio de la disbiosis microbiana en sistemas de acuicultura (Minich, J. J. et al., 2020; Shephard, 1994). Además, el estudio de otros componentes del sistema, como biopelículas del tanque, biofiltros y la columna de agua, se han vuelto trascendentales en el estudio del microbioma del RAS. Los estudios apuntan a que las muestras de agua en un RAS en salmón del Atlántico están dominadas por *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* o *Actinobacteria* (Fossmark et al., 2020; Lu et al., 2019; Minich, J. J. et al., 2020). Mientras que, a nivel de género, la dominancia es variable (Fossmark et al., 2020; Minich, J. J. et al., 2020; Nagpal et al., 2018).

Por otro lado, cada vez es más frecuente el estudio del metagenoma microbiano a nivel funcional. Sin embargo, este se encuentra enfocado sólo en el

análisis funcional general del metagenoma microbiano (Dehler et al., 2017; Kobiyama et al., 2018; Lorgen-Ritchie et al., 2021). Ciertas vías funcionales como el metabolismo de compuestos inorgánicos podrían ser un punto importante para analizar, por la utilidad en términos de calidad de agua del RAS. La acumulación de compuestos inorgánicos como nitrito y amoníaco, generan toxicidad en los peces (Baker et al., 2022; Chen et al., 2006). En salmónidos como coho y trucha arcoíris, causa una reducción en la sobrevivencia y crecimiento (Baker et al., 2022). Por otro lado, las concentraciones sub-letales de H_2S generan necrosis hepática producto de la exposición prolongada (Kierner et al., 1995). Si bien, los biofiltros cumplen la función nitrificante, la calidad del agua modifica la estructura del biofiltro. Esto puede afectar la composición bacteriana, disminuyendo su efectividad (Blancheton et al., 2013). Con respecto al H_2S , graves incidentes, con gran mortalidad de peces, se han ocasionado en Noruega (Åtland et al., 2020). En estudios en RAS se ha observado el aumento de bacterias reductoras de sulfato en la columna de agua, bajo ciertas condiciones (Fossmark et al., 2020; Rojas-Tirado et al., 2021), lo que podría producir una exposición crónica de los peces. Por lo que analizar, en términos funcionales, que otros miembros de la comunidad microbiana aportan a estas vías es necesario.

La comunidad microbiana de peces ha sido explorada principalmente por métodos moleculares basados en tecnologías de secuenciación. Sin embargo, la región completa no es ampliamente utilizada. Diferentes regiones del genoma, como la V1-V2, V3-V4 o V4-V5 son utilizadas para el estudio del microbioma en acuicultura (Almeida et al., 2021; Dehler et al., 2017; Patil et al., 2021; Wang et al., 2021). Sin embargo, existe un sesgo cuando se estudian regiones parciales o

individuales debido a que se ha observado que la diversidad taxonómica se ve afectada por la región hipervariable secuenciada (Kerrigan et al., 2019; Sperling et al., 2017). Además, las regiones por sí mismas no son suficientes para estimaciones precisas de riqueza y clasificación taxonómicas altas o a nivel de especie, sólo es posible una identificación a nivel de género (Jeong et al., 2021; Yarza et al., 2014). En los últimos años, la secuenciación del gen del ARNr 16S completo con la tecnología Nanopore (Oxford Nanopore Technologies) se ha sugerido como una herramienta con mejor resolución para identificar comunidades microbianas a nivel de especies y en niveles taxonómicos más altos (Fujiyoshi et al., 2020; Johnson et al., 2019; Nygaard et al., 2020). Cada día se están optimizando las técnicas para el estudio del microbioma y la pesquisa precisa de patógenos mediante la secuenciación completa del gen ARNr 16S (Cusco et al., 2018; Low et al., 2021). En ese sentido, en anteriores estudios ya mostramos la capacidad de utilizar la tecnología Nanopore en la identificación a nivel de género y especie de potenciales patógenos de salmón del Atlántico en *Caligus rogercresseyi* (Gonçalves et al., 2020; Morales-Rivera et al., 2022). Además, esta tecnología no sólo se utiliza para el estudio del microbioma, si no también para el estudio de la variación genética de salmónidos y la detección de patógenos virales tanto en salmónidos como en otras especies (Bertolotti et al., 2020; Delamare-Deboutteville et al., 2021; Gallagher et al., 2018; Macqueen et al., 2021).

En Chile, el salmón del Atlántico es la especie preferida de salmónidos en los criaderos, representando el 72% de la producción (Sernapesca, 2021). Por lo que métodos para la optimización de la evaluación sanitaria de los peces es requerida. Usando como base que el conocimiento de la microbiota en su conjunto puede

darnos una idea del estado general del RAS durante un brote de enfermedad; en este trabajo exploramos el uso de tecnologías de secuenciación de tercera generación para estudiar la microbiota y la metagenómica funcional en muestras de agua e intestino en un sistema RAS para identificar los agentes etiológicos probables y los agentes causantes de enfermedad en peces afectados durante un brote epidémico en que no pudo identificarse el agente etiológico, mediante pruebas de PCR tradicionales contra microorganismos clínicamente sospechosos.

Metodología

Antecedentes generales y muestras.

En un sistema RAS de agua dulce de cultivo de salmón del Atlántico, se reportaron peces afectados por un agente etiológico no conocido luego del proceso de vacunación. Esto ocasionaba disminución de la calidad del *smolt* y mortalidad pre y post ingreso al agua de mar. Los tanques afectados acumulaban una mortalidad de 0,54% en 35 días posterior a un proceso de vacunación. Además de la necesidad de una selección en la salida post-vacunación. De los peces descartados, el 30% presentó distensión abdominal. El informe preliminar entregado por la empresa indicaba que los peces con distensión abdominal presentaron diversos grados de peritonitis (Figura 1A). Además, el examen histológico reveló severa inflamación polimorfonuclear granulomatosa multifocal de ciegos pilóricos con una necrosis central (Figura 1B). Se sospechó de una infección causada por *Rhodococcus* sp., en base a la epidemiología local junto con la morfología y afinidad tintorial revelada en la tinción de Gram (Figura 1C). Sin embargo, los resultados de

PCR para los patógenos *Rhodococcus* sp. y *Francisella* sp. fueron negativos. Por otro lado, se informó la presencia de hifas septadas sugerentes a *Exophiala salmonis* en branquias, páncreas y riñón (Figura 1D). La densidad de los tanques era de 50 Kg/m³. Referente a la calidad de agua, se informó en promedio, los siguientes parámetros: CO₂ 11,93 mg/L, salinidad 4,58 ppt, temperatura 14,3°C, pH 6,8, TAN 0,48 mg/L, NO₂⁻ 0,69 mg/L, NO₃⁻ 101,2 mg/L, alcalinidad 92,73 mg/L. Adicionalmente, fueron reportados altos niveles de solidos suspendidos.

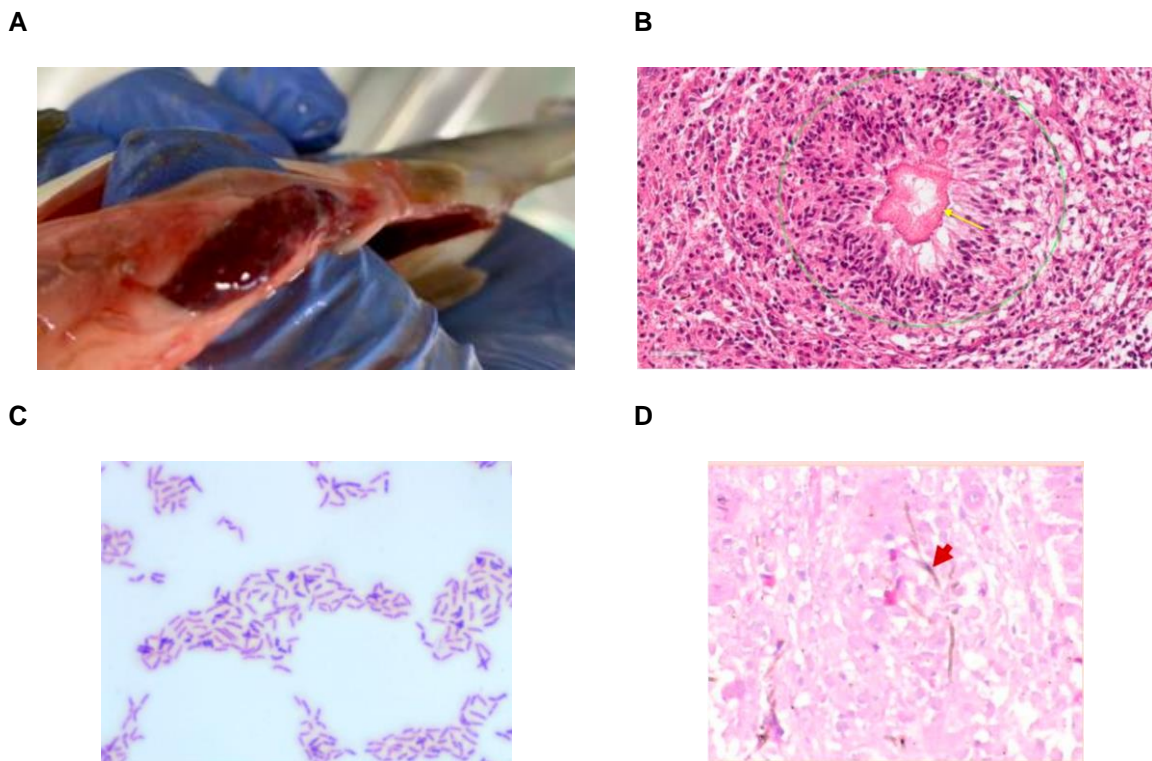


Figura 1. Antecedentes preliminares del estado de salud de los peces. **A.** Necropsia de la mortalidad con evidencia de peritonitis. **B.** Ciegos pilóricos, aumento 40X. célula gigante (circulo) con presencia de necrosis central (flecha). **C.** Tinción Gram a colonias crecidas en agar sangre a partir de exudado de hígado. **D.** Hifas septadas sugerentes a *Exophiala* sp.

Para la secuenciación, se recibieron muestras de intestino y ciegos pilóricos

de grupos de peces sin distensión abdominal (no_BL1 y no_BL2) y con distensión abdominal (BL). Adicionalmente se incluyeron muestras de agua del sistema, las que incluyen la bocatoma, (Boca), decantador (Deca), entrada al biofiltro (Z100), salida del biofiltro (Z200).

Extracción de ADN y amplificación del gen ARNr 16S completo

Después de retirar las heces del intestino de los peces, se aisló el ADN de las muestras utilizando el kit DNAeasy blood & tissue (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN de las muestras de agua se extrajo de filtros de 0,45µm utilizando un kit Quiamp Fast DNA Stool (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se agruparon tres muestras de agua por sitio y tres muestras de intestino de pescado por tanque en una concentración final de 100 ng/µL. El gen de ARNr 16S completo se amplificó usando los primers 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (Sun et al, 2008). Para la amplificación se utilizó ADN polimerasa Taq LongAmp (NewEngland Biolabs, USA), con un volumen de reacción de 15 µL, en las siguientes condiciones: 95 °C por 1 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 20 s, 56 °C por 30 s, y 65 °C por 1 min, finalizando con una extensión final a 65 °C por 5 min. La eficacia de la PCR se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Síntesis y secuenciación de bibliotecas de nanoporos.

Los productos de PCR se purificaron en una proporción de muestra de 1:2 utilizando perlas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, EE. UU.) para la síntesis de las bibliotecas Nanopore. Las muestras se colocaron en el soporte magnético para su

lavado con etanol 70% (recién preparado). El producto lavado se separó de las perlas colocándolo en un soporte magnético después de enjuagarlo con agua estéril ultrapura. El amplicón purificado se cuantificó nuevamente en el fluorómetro Qubit 4 (ThermoScientific, EE.UU.) y se usó como templado para la síntesis de la biblioteca con el kit de Barcoding 16S (SQK-RAB204, Oxford Nanopore Technologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante para la estrategia de secuenciación 1D. Brevemente, el amplicón purificado se mezcló con los barcodes. Luego, se realizó una PCR como se indicó en el paso anterior, con un volumen de reacción final de 50 uL, utilizando LongAmp Taq Polymerase (New England Biolabs). El producto de PCR se incubó durante 5 min a temperatura ambiente en HulaMixer (ThermoScientific, EE. UU.) y se limpió con perlas Agencourt AMPure XP. El producto purificado se eluyó en 10 uL de tampón de elución (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 con NaCl 50 mM) siguiendo el procedimiento de lavado de las perlas magnéticas. La concentración final de la biblioteca se midió con un fluorómetro Qubit 4 (Thermoscientific, EE. UU.), y las bibliotecas se analizaron con High Sensitivity D5000 ScreenTape (Agilent, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un TapeStation Bioanalyzer 2100 (Agilent, EE. UU.). Siguiendo la metodología de Oxford Nanopore Technologies, las bibliotecas se agruparon en modo multiplex y se colocaron en la celda de flujo MK1 Spot-ON FLO-MIN107-R9. Como control interno, se extrajo y secuenció el ADN de una comunidad microbiana simulada (ZymoBiomics Microbial Community Standard), siguiendo los mismos procedimientos descritos, y se comparó la abundancia observada de taxa con su abundancia esperada. La eficiencia de la secuenciación fue monitoreada a través del software MinKNOW 2.0 (Oxford Nanopore Technologies).

Análisis bioinformático.

A los archivos fast5 generados se les realizó el proceso de “basecalling” con la herramienta Guppy (versión 3.2.2, Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido) y se aplicó un filtro para retener sólo secuencias con un puntaje $Q \geq 7$ (filtro de calidad). El proceso llamado “demultiplex” y recorte de los adaptadores junto con los “barcodes” se realizaron con Porechop. Se realizó un filtro por tamaño de secuencia de 1000-1800 pb y Q-score ≥ 8 con la línea de trabajo Nanofilt. Las secuencias limpias fueron alineadas con la base de datos de taxonomía 16S NCBI con BLASTN dentro de la plataforma Epi2Me (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido). Los resultados lca=-1 (sin clasificación exitosa) y los taxa de baja abundancia con menos del 0,01 % del total de lecturas se descartaron del análisis. Se utilizaron los índices 1-D de Simpson y Shannon para estimar la diversidad alfa, mientras que el índice de Pielou se utilizó para estimar la uniformidad. La estructura de la comunidad microbiana se analizó utilizando distancias de Bray-Curtis basadas en datos de abundancia relativa de taxón, y se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) como una exploración de datos multivariada no supervisada. Todos los índices y PCoA se calcularon utilizando el paquete "Vegan" de R (Dixon, 2003). Con la herramienta TaxonKit se consultó el linaje taxonómico completo (Shen y Ren, 2021). Las variaciones del microbioma intestinal se exploraron trazando la abundancia relativa a nivel de phylum, género y especie en el software estadístico R (R-Core-Team, 2020) utilizando el paquete "ggplot2" de R. La microbiota central se identificó con un límite de prevalencia del 80 % y un límite inferior de abundancia relativa del 0,05 %. El Log2 de la abundancia relativa por taxones en las muestras se trazó como un “heatmap” con el paquete "Pheatmap" de R. Las bacterias

patógenas se identificaron en la lista de peces patógenos de Austin (Tabla S1) y se trazaron por muestra con un límite de abundancia relativa inferior del 0,05 % utilizando el paquete "ggplot2" de R (Austin and Austin, 2016).

Predicción funcional del metagenoma

Se predijeron las vías funcionales para todo el microbioma utilizando la herramienta PICRUSt2 a partir de secuencias de amplicón del ARNr 16S (Douglas et al., 2020), usando la región V3-V4 de las secuencias. Para ello, las regiones se extrajeron con la herramienta Hyperex. Los gráficos de las vías funcionales se construyeron utilizando la base de datos MetaCyc (Caspi et al., 2018). La gráfica de abundancia relativa se construyó utilizando R. Usamos el programa STAMP 2.1.3 para graficar las diferencias significativas en las contribuciones de las vías (Parks et al., 2014). Mediante la configuración de STAMP 2.1.3, se aplicó una prueba G bilateral corregida por Benjamini-Hochberg. La diferencia de proporciones (DP) y los intervalos de confianza (CIs) se calcularon mediante el método de Newcombe-Wilson. Se realizaron múltiples correcciones de prueba utilizando el valor q de Storey (Yadav y Kapley, 2019). Para la construcción de gráficos, se utilizaron datos con una abundancia relativa mínima de 0,5 para determinar la diferencia de proporciones. Se realizaron análisis de metabolismo de nitrógeno y azufre de muestras de agua. Se generó un gráfico de abundancia relativa utilizando la superclase MetaCYC del metabolismo de nutrientes inorgánicos, incluida una contribución de OTU por vía. Mediante PICRUSt2, se extrajeron las vías funcionales relacionadas con el metabolismo del nitrógeno y sulfuro utilizando la base de datos KO (KEGG Orthology). Luego, construyó un mapa basado en el metabolismo del

nitrógeno y sulfuro mediante la plataforma en línea KEGG Mapper (Kanehisa y Sato, 2020; Kanehisa et al., 2022).

Resultados

Análisis de los datos

1.118.214 lecturas pasaron los filtros de Guppy, demultiplex y eliminación de adaptadores y partidores. De ellos, 89.743 pasaron los filtros de tamaño y fueron sometidos a la clasificación taxonómica por Epi2me. El 95% de los reads lograron una clasificación taxonómica exitosa. Del total de reads clasificados, un 62 % poseen un valor de $lca=0$ y un 38 % un $lca=1$ (Tabla S2). Para lograr una fidedigna clasificación a nivel de género y especie, aquellas secuencias clasificadas con un valor de $lca = 1$ fueron asignados taxonómicamente hasta nivel de familia.

Composición general de la microbiota

En total, 746 taxa fueron identificadas entre las muestras de agua e intestino (Tabla S3). Las curvas de rarefacción indican que todas las muestras alcanzan el plató, esto significa que es suficiente para la clasificación taxonómica (Figura 2A). El análisis de coordenadas principales por el método de Bray-Curtis muestra los *pools* de las muestras Deca, Z200 y Z100 en 1 clúster (Figura 2B). El resto de los *pools* de muestras se encuentran de manera independiente. A pesar de ello, se observa que las muestras de intestino de los peces con y sin distensión abdominal (BL, no_BL1, no_BL2) son espacialmente más cercanas con respecto a las otras muestras (Figura 2B). Con respecto a la diversidad, los grupos Deca y Z200 son

los que presentan mayores índices de Simpson's (0,98 y 0,99) y Shannon's H' (5,05 y 5,12) (Figura 2C and D). Le siguen los otros grupos, con excepción del intestino de los peces con distensión (BL) que es el que presenta el más bajo índice de diversidad (Simpson's 0,58 y Shannon's H' 1,93). Si se compara con los resultados entregados por el índice de Pielou's, BL es el grupo menos uniforme (0,11) (Figura 2D), mientras que los otros grupos de muestras presentan valores más altos del índice (0,14 – 0,18) (Figura 2D).

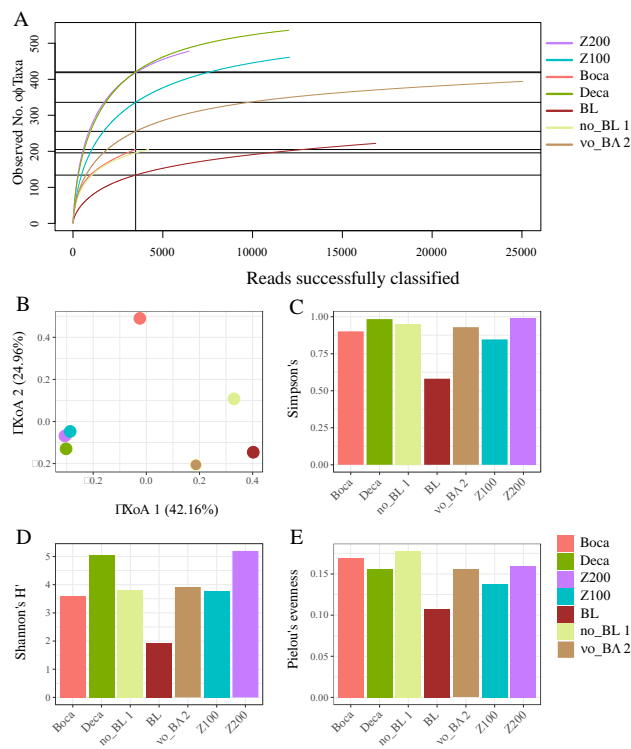


Figura 2. Análisis de los datos obtenidos de las muestras de RAS. Muestras de intestino de salmón del Atlántico con distensión abdominal (BL) y sin distensión (no_BL1 y no_BL2) y muestras de agua de la bocatoma (Boca), decantador (Deca), entrada del biofiltro (Z100) y salida del biofiltro (Z200). **A.** Curva de rarefacción **B.** Gráfico PCoA de la diversidad beta del microbioma calculada mediante disimilitud Bray-Curtis. **C.** Índice de Simpson's 1-D. **D.** Índice de diversidad de Shannon. **E.** Índice de uniformidad de Pielou's.

Se identificaron 14 phyla entre todas las muestras analizadas; sin embargo,

fueron graficadas aquellas que mostraron una abundancia relativa por muestra mayor al 0,5% (Figura S1A). Entre los phyla más abundantes podemos mencionar *Proteobacteria*, que representan entre el 57 y 98 % de total de la composición por muestra. Seguido de *Firmicutes* (1,1-35,42 %) y *Bacteroidetes* (1,4-25,5 %). Sin embargo, los peces con distensión y sin distensión abdominal (BL y no_BL2) presentan una abundancia relativa menor a 0,5% de los dos phyla anteriormente mencionados. Adicionalmente, las muestras de peces son las que presentan menor diversidad de phyla. Por otro lado, se encontraron ciertos phyla únicos por muestra. Por ejemplo, *Cyanobacterias* y *Planctomycetes* sólo están presentes en la bocatoma. Mientras que, *Fusobacteria* y *Verrucomicrobia* sólo están presentes en las muestras de agua. A un nivel taxonómico menor se observa que en la muestra de agua bocatoma destacan el género *Streptococcus* (27 %) seguido de la familia *Enterobacteriaceae* (15,56 %) (Figura S1B). Mientras que en el decantador hay una distribución más uniforme de los taxa representados. Por otro lado, de la microbiota intestinal los peces destacan los géneros *Clostridium*, *Aliivibrio* y la familia *Arcobacteraceae*. En la entrada del biofiltro domina la familia *Enterobacteriaceae*, mientras que en la salida hay una distribución más uniforme de los taxa (Figura S1A). Un análisis general nos indica que los phyla *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* representan el núcleo microbiano en todas las muestras (Figura S1C). A nivel de género se lograron identificar en el núcleo *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas* y *Paracoccus* (Figura S1C).

Composición a nivel de especie y potenciales patógenos

A nivel de especie, la mayoría posee una abundancia relativa total menor al

10 %, con algunas excepciones (Figura 3A). En la bocatoma se destaca la presencia de *Streptococcus thermophilus* (26.60%), mientras que en el decantador la mayor abundancia esta representada por *Simplicispira limi* (3 %). Con respecto a la microbiota intestinal de los peces, observamos que en no_BL1 destaca *Clostridium chromiireducens* (13,97 %), mientras que en la muestra BL, *Aliivibrio wodanis* representa el 64,01 % de la abundancia relativa total. Por otro lado, la especie más abundante en la microbiota intestinal de la muestra no_BL2 resulto ser *Pseudomonas protegens* con un 5,46 %. Con respecto a la entrada y salida de los biofiltros, la abundancia relativa de los top 5 es más uniforme que la observada en las otras muestras. Varía entre el 0,96 y el 1,67% en el caso de la entrada Z100. Mientras que en el la salida Z200 esta varía entre el 1,74 y el 2,37 % (Figura 3A).

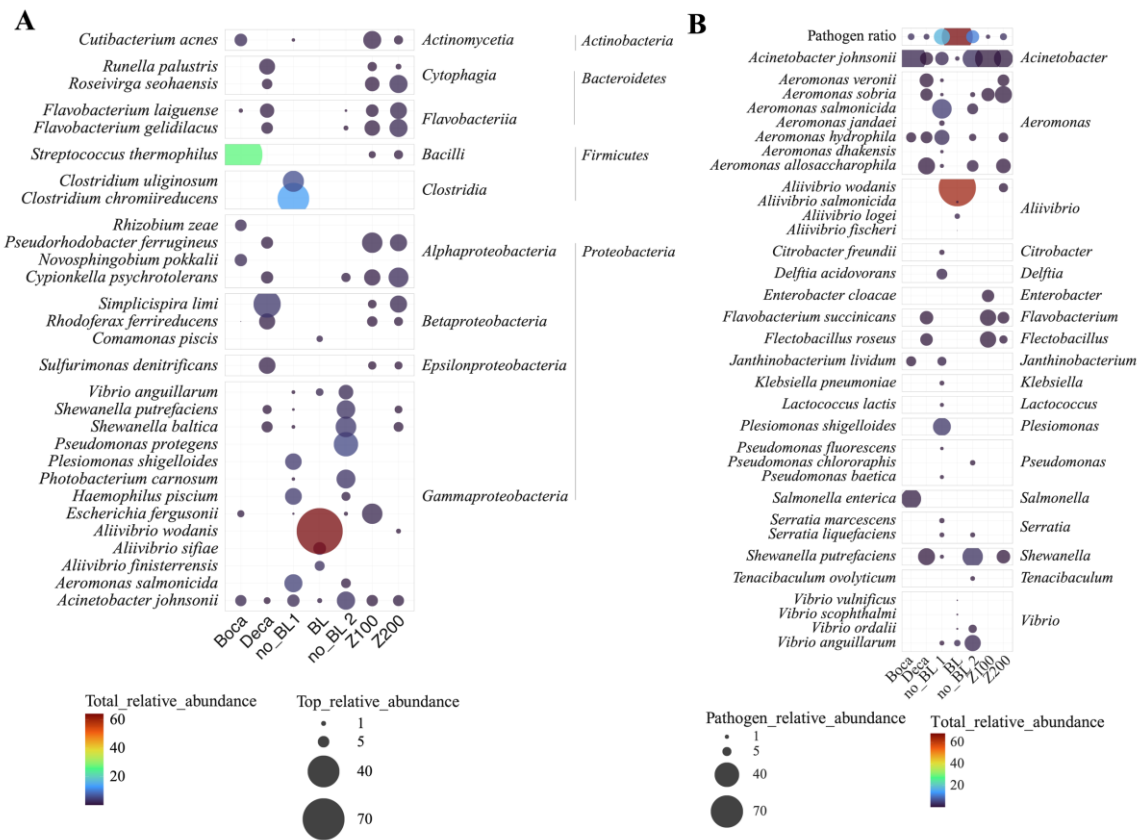


Figura 3. Abundancia relativa de la composición de la microbiota del RAS. Muestras de Intestino de salmón del Atlántico con distensión y sin distensión (no_BL1 y no_BL2) y muestras de agua de bocatoma (Boca), decantador (Deca), entrada al biofiltro (Z100) y salida del biofiltro (Z200). **A.** Abundancia relativa total a nivel de especie **B.** Abundancia relativa de potenciales patógenos encontrados en las muestras.

Se representaron gráficamente todos los potenciales patógenos de peces con una abundancia mínima de 0,1% por muestra (Figura 3B). Las muestras de agua son las que contienen menor cantidad de microorganismos potencialmente patógenos que las muestras de intestino de peces. En general, la abundancia relativa de los potenciales patógenos en las muestras de agua es menor al 1,7%. Mientras que en las muestras de peces sube al 5 % con una excepción que supera esta cifra (BL). En la bocatoma y la entrada al biofiltro Z100 la mayor abundancia corresponde a *Acinetobacter johnsonii* (1,70 %, 0,72 %). Además, esta bacteria está presente en todas las muestras. Mientras que en el decantador *Aeromonas allosaccharophila* (0,39 %) y *Shewanella putrefaciens* (0,4 %) son las más abundantes. Con respecto a la microbiota potencialmente patógena en el intestino de los peces, destacan los géneros *Aeromonas*, *Aliivibrio*, *Plesiomonas*, *Shewanella* y *Vibrio*. En particular, no_BL1 *Aeromonas salmonicida* (4,44 %) es la más abundante. Se repite la presencia de este microorganismo en la muestra no_BL2 (0,85 %). Destaca también en la muestra no_BL1 *Plesiomonas shigelloides* (3,7 %) que está presente únicamente en este tanque. En los peces con distensión abdominal, destaca la abundancia de *A. wodanis* (64 %), bacteria que en las muestras de agua sólo se encuentra en la salida del biofiltro Z200 con una abundancia < 0,15 %. Además, no es posible encontrarlo en ninguna otra muestra.

En la muestra no_BL2, *A. johnsonii* (3,02 %) y *S. putrefaciens* (3,11 %) son las más abundantes. Además, *S. putrefaciens* está presente en muestras de agua del decantador y en la salida del biofiltro Z200. Adicionalmente, *V. anguillarum* está presente en todas las muestras de peces con y sin distensión abdominal, con abundancias relativas entre los 0,24 y los 1,94 %. Otros potenciales patógenos importantes en el cultivo de salmónidos como *Vibrio ordalii* están presentes en los peces de las muestras BL y no_BL2. Eso se suma a la presencia de *Aeromonas hydrophila* que se encuentra presente en casi todas las muestras a excepción de la entrada del biofiltro Z100 y la muestra BL.

Análisis funcional del metagenoma microbiano

El análisis funcional en términos de MetaCyc nos entrega 398 vías funcionales. Los cuales se reducen a 52 en términos de nivel 2 y a 6 en términos de nivel 1 (Tabla S4). En el caso de las muestras de microbiota intestinal de los peces, los resultados muestran que 17 vías funcionales poseen diferencia significativa entre proporciones mayor a 0,2 %. Destaca en contribución aquellos vías funcionales relacionadas a biosíntesis, en particular biosíntesis de ácidos grasos y lípidos en los peces con distensión abdominal (Fig 4). Por otro lado, la segunda mayor diferencia entre proporciones en las vías funcionales de nivel sec corresponde a fermentación (Generation of Precursor Metabolite and Energy pathway), en donde las muestras de los peces sin distensión abdominal es en donde mayor contribución de la microbiota hay. La mayor contribución de las vías funcionales que están relacionados con duplicación celular como “Cell Structure Biosynthesis” por parte de la microbiota de los peces con distensión abdominal en comparación con los que

no la tienen. Si bien, “Aromatic compound degradation” posee una menor contribución por parte del metagenoma, la diferencia entre proporciones es significativamente mayor, beneficiando a los peces sin distensión. Caso contrario, “Amino acid Biosynthesis” es el tercer pathway más representado; sin embargo, posee una diferencia entre proporciones menor.

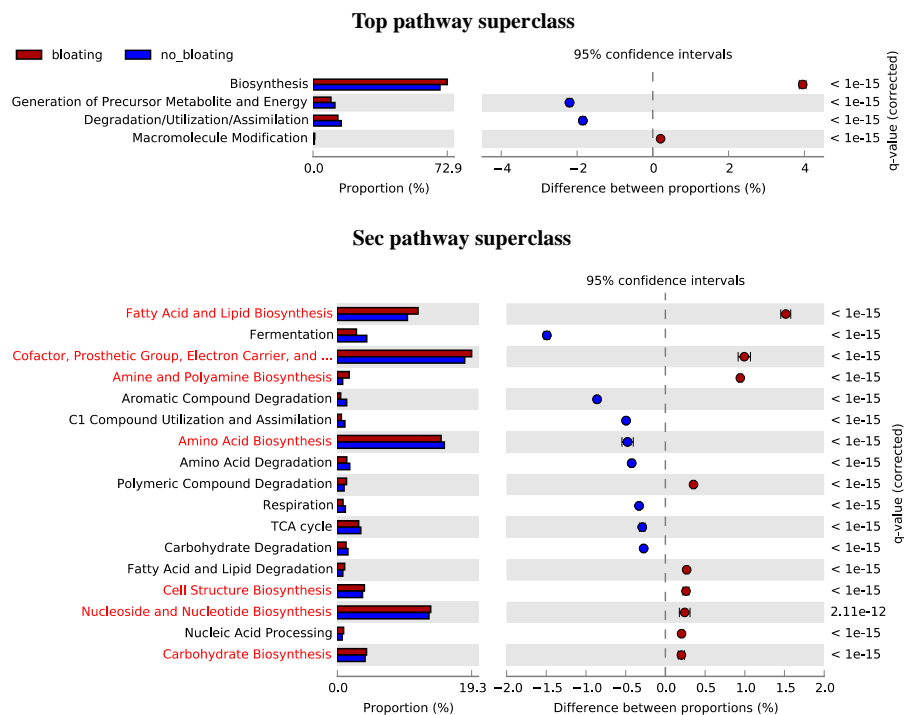


Figura 4. Análisis funcional del metagenoma microbiano de las muestras de intestino de salmón del Atlántico en RAS de agua dulce. Gráfico realizado mediante programa STAMP de la abundancia relativa y diferencia entre proporciones (tamaño de filtro >0,2) inferido por PICRUST2 utilizando la base de datos MetaCyc. Muestras de Intestino de salmón del Atlántico con distención y sin distención (no_BL1 y no_BL2). En rojo, clasificación a nivel funcional sec del nivel funciona top que posee las mayores diferencias entre proporciones.

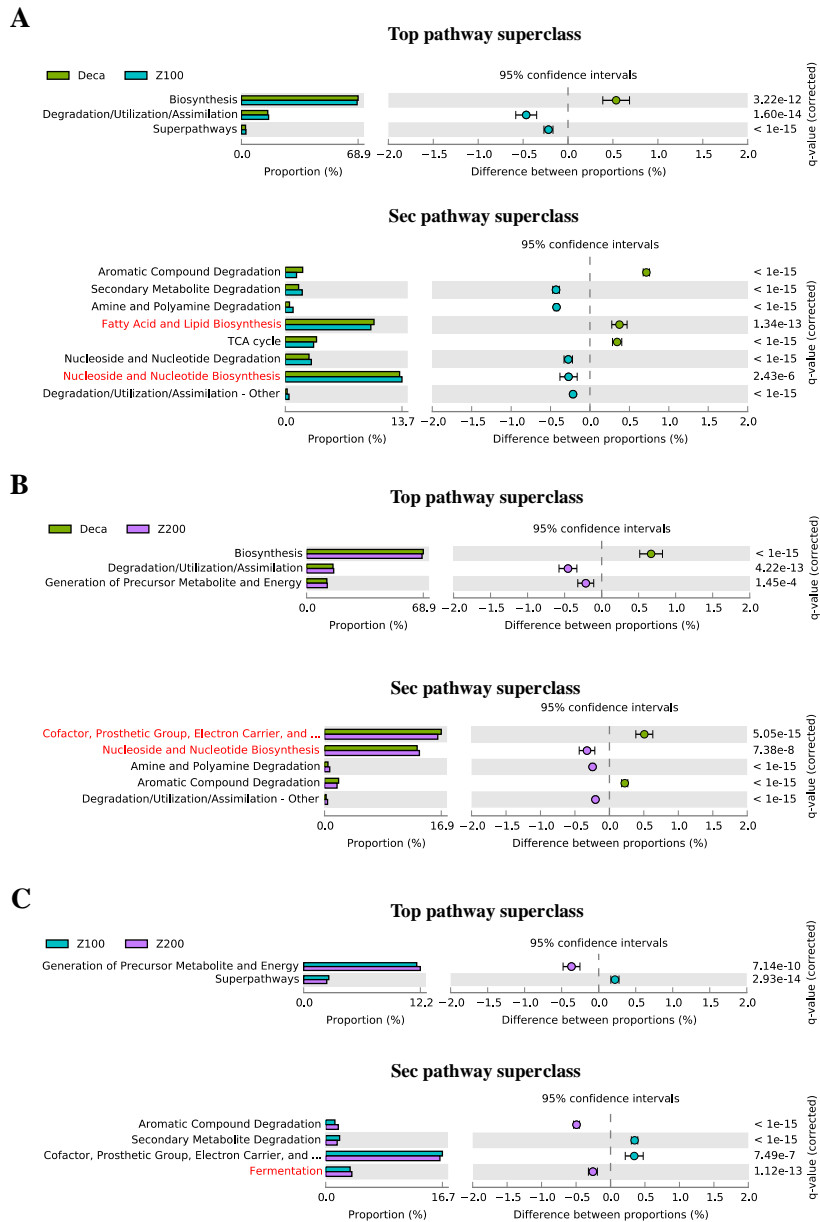


Figura 5. Análisis funcional del metagenoma microbiano de las muestras de agua de RAS agua dulce utilizado para el cultivo de salmón del Atlántico. Gráfico realizado mediante programa STAMP de la abundancia relativa y diferencia entre proporciones (tamaño de filtro >0,2) inferido por PICRUSt2 utilizando la base de datos MetaCyc. Muestras de agua de la bocatoma (Boca), del decantador (Deca), entrada del biofiltro (Z100), salida del biofiltro (Z200). En rojo, clasificación a nivel funcional sec del nivel funciona top que posee las mayores diferencias entre proporciones.

Entre las muestras de agua, 26 pathway sec con una abundancia relativa mayor al 0,5 % fueron identificados (Figura S2B). Sin embargo, es menor la cantidad de pathway cuyas diferencias entre proporciones es mayor a 0,2 % (Figura 5). Además, estas diferencias entre proporciones no superan el 0,8 %. Similar a las muestras de intestino, la mayor contribución de la microbiota está asociada a los procesos de biosíntesis.

Metabolismo de compuestos inorgánicos

En el nivel 2 de “Inorganic Nutrient Metabolism” se encuentran los sub-pathway relacionados con metabolismo del sulfuro y del nitrógeno. Tanto en las muestras de intestino como en las muestras de agua estas vías funcionales se encuentran representados por la microbiota en el RAS, tanto en las muestras de intestino como en las muestras de agua (Figura S2A y S2B). Sin embargo, no hay diferencias significativas entre las muestras en términos generales. Por otro lado, al observar a un nivel funcional inferior si se revelan diferencias entre vías funcionales. Observamos que el metabolismo del sulfuro es el más representado y se encuentra favorecido en la microbiota intestinal de los peces con distensión abdominal (Figura 6A). En particular la reducción de sulfato y la asimilación para la biosíntesis de cisteína están particularmente favorecidas en la microbiota intestinal de los peces con distensión (Figura 6B).

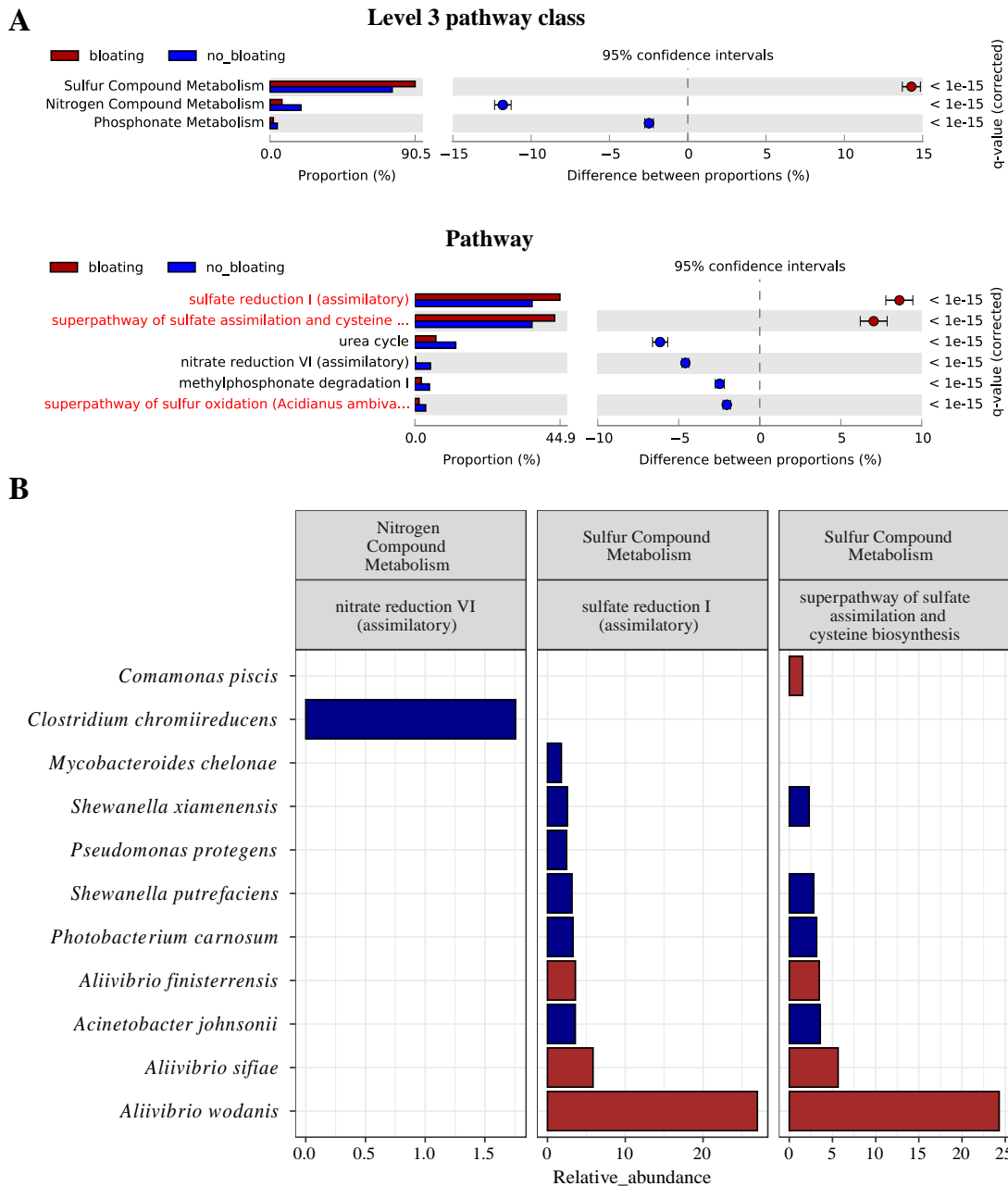


Figura 6. Análisis funcional del metagenoma microbiano de las muestras de agua de RAS agua dulce utilizado para el cultivo de salmón del Atlántico. Abundancia relativa de las vías metabólicas inferidas por PICRUSt2 utilizando la base de datos MetaCyc. Muestras de agua de la bocatoma (Boca), del decantador (Deca), entrada del biofiltro (Z100), salida del biofiltro (Z200). **A.** Análisis STAMP de abundancia relativa y diferencia entre proporciones de con un tamaño de filtro entre proporciones de 0,2. **B.** Principales microorganismos implicados en los procesos de metabolismo de los compuestos inorgánicos inferidos por PICRUSt2.

En términos KEGG, los KOs relacionados con el metabolismo del sulfuro se encuentran mas completos en las muestras de peces con distensión abdominal (Figura S3A). En términos de microorganismos que podrían estar contribuyendo en mayor medida, se observa que *Clostridium chromiireducens* está vinculado a la reducción de nitrato en peces sin distensión abdominal. Mientras que bacterias del género *Aliivibrio* son las que mas contribuyen al metabolismo del sulfuro en las muestras de intestino de los peces con distensión abdominal (Figura 6B). En las muestras de agua, el proceso de metabolismo de sulfuro es el que se encuentra mayormente representado (Figura 7A). seguido del metabolismo del nitrógeno. Sin embargo, no hay diferencias entre proporciones entre el decantador y la entrada al biofiltro. Tampoco entre la entrada y salida del biofiltro. Por otro lado, las mayores diferencias entre proporciones están enfocadas en el metabolismo del fosfato. En particular, con procesos vinculados con degradación. Además, los procesos de desnitrificación y nitrificación se encuentran favorecidos en la muestra de agua del decantador más que en las entradas y salidas del biofiltro. Los procesos oxidación de amonio (nitrificación) no poseen una diferencia entre proporciones relevante; sin embargo, si se encuentran representados en términos de KEGG en el módulo Nitrificación (Figura S3 B). El único módulo incompleto es el relacionado a la generación de nitrógeno a partir de nitrato y amonio (módulo Anammox). Con respecto a los microorganismos, aquellos que ejercen mayor contribución en estos procesos son *Simplicispira limi*, *Pseudorhodobacter ferrugineus* y *Cypionkella psychrotolerans* (Fig. 7B). Mientras que en asimilación de nitrato destaca únicamente *Flavobacterium laiguense* y en la oxidación de sulfuro destaca

Deinococcus saxicola.



Figure 7. Análisis funcional del metagenoma microbiano del metabolismo de compuestos inorgánicos de las muestras de intestino de salmón del Atlántico en RAS agua dulce. Abundancia relativa de las vías metabólicas inferidas por PICRUSt2 utilizando la base de datos MetaCyc. Muestras de Intestino de salmón del Atlántico con distensión y sin distensión (no_BL1 y no_BL2). **A.** Análisis STAMP de abundancia relativa y diferencia entre proporciones de con un tamaño de filtro entre proporciones de 0,2. **B.** Principales microorganismos implicados en los procesos de metabolismo de los compuestos inorgánicos inferidos por PICRUSt2.

Por otro lado, en el metabolismo del sulfuro nos encontramos que los módulos de reducción de sulfato están completos para todas las muestras, pero aquellos procesos que permiten la oxidación no están completamente representados por el microbioma. Este proceso no se vio representado en el análisis de vías funcionales según MetaCyc. Sin embargo, en termino de KEGG, los módulos asimilatorio, disimilatorio y SOX se encuentran representados por todas las muestras de agua (Figura S3 C). Adicionalmente, existe una vía alternativa de síntesis de H₂S que se encuentran representado por los KOs K01697, K01758 y K01011 en términos de KEGG que están presentes en todas las muestras, tanto de intestino como de agua (Table S5).

Discusión

Los sistemas RAS permiten controlar y mejorar parámetros que en los sistemas de flujo no es posible (d'Orbcastel et al., 2009; Minich, J. J. et al., 2020). Además, permite medir la implementación de técnicas y parámetros para su mejora, reducción del impacto ambiental y adaptación al cambio climático (Ahmed and Turchini, 2021; Bauer et al., 2021; Yogev and Gross, 2019). Si bien, la mayoría de los criaderos se utilizan para producir ovas y luego transferirlas a jaulas de engorde en el océano, los ciclos completos de producción de salmón en RAS terrestres son cada vez más comunes (Fossmark et al., 2021; Minich, J. J. et al., 2020; Moschos et al., 2022). En este trabajo se estudió la composición de la microbiota en un RAS de agua dulce que presentó problemas de mortalidad luego de evento de vacunación mecánica. Los peces afectados presentaban una peritonitis

granulomatosa. Sin embargo, no se identificó el agente etiológico de la enfermedad. En búsqueda del agente etiológico responsable y exploración del estado microbiológico del RAS, se secuenció el gen del ARNr 16S completo. Unidades taxonómicas operativas terminan agrupando diferentes especies en una sola debido a que se generan con identidades de 97 a 99 %. Esto dificulta la identificación a nivel de especie debido a que algunas especies poseen un rango más acotado de identidad para la clasificación (Johnson et al., 2019). En el desarrollo del *workflow* de epi2Me cada *read* es asignado taxonómicamente y luego se le asigna un porcentaje de precisión, por lo que es posible agrupar a un nivel más estricto, sin tener que descartar secuencias. Esto permitió que un 98 % de los *reads* logaran una clasificación taxonómica exitosa. En cuanto a la composición general, este estudio muestra una baja diversidad de especies en el microbioma de intestino de peces con distensión abdominal. En general, una baja diversidad en la microbiota intestinal es un marcador de disbiosis y se ha asociado a una variada gama de enfermedades en humanos (Valdes et al., 2018). Con respecto a la salud de los peces, Ofek *et al.* (Ofek et al., 2022) descubrió que, al comparar la diversidad microbiana de intestino de tilapia saludable y no saludable, aquella no saludable posee un menor índice de alpha-diversidad, medido por Shannon. Entre la sintomatología externa por la cual fueron seleccionados los peces, se incluyen exoftalmos oculares y hemorragias cutáneas junto con lesiones y necrosis cutáneas (Ofek et al., 2022). Sin embargo, se podrían realizar estudios utilizando otra sintomatología clínica como marcador.

Por otro lado, la gran presencia de *Proteobacteria* coincide con lo encontrado en otros estudios de microbioma de peces, incluido salmón del Atlántico (Almeida

et al., 2021; Dehler et al., 2017; Fossmark et al., 2020; Gajardo et al., 2016; Kim et al., 2021; Lorgen-Ritchie et al., 2021; Wang et al., 2021). Curiosamente, en tilapia híbrida (*Oreochromis aureus* × *Oreochromis niloticus*) los peces enfermos presentan una mayor proporción de *Proteobacteria* que los peces sanos (Ofek et al., 2022). Esto se relaciona con la proporción de *Proteobacteria* encontradas en los peces con distensión abdominal en nuestro estudio, la cual supera el 98 %. La presencia de otros phyla en la bocatoma nos muestra que los sistemas de purificación disminuyen la diversidad microbiana de la entrada de agua. Phyla distintas entre las muestras de agua con respecto a la microbiota intestinal han sido informadas en otros estudios. Minich *et al.* (Minich, J. J. et al., 2020) determinó que la microbiota de branquias, piel y muestras de agua son más similares entre sí, en comparación a muestras de intestino. Además, el primer contacto entre los patógenos y el hospedero son las mucosidades. Esto incluye la piel y branquias, no sólo intestino (Minich, Jeremiah J. et al., 2020; Padra et al., 2019; Shephard, 1994). Además, se ha encontrado que en úlceras de salmón del Atlántico, cuya microbiota dominante es *Tenacibaculum* y *Arcobacter*, son simultáneamente colonizadas por bacterias de los géneros *Aliivibrio* y *Alcaligenes* en el intestino de los peces (Karlsen et al., 2017). Quizás para futuros análisis, es necesario incluir muestras de piel y branquias para complementar el estudio de estado de salud general del RAS.

A nivel de género, Ofek *et al.* (Ofek et al., 2022) observaron un aumento considerable de bacterias del género *Aeromonas*, *Vibrio* y *Streptococcus* en las muestras de tilapia enferma. En nuestro estudio los patógenos principales incluyen *Aeromonas* y una gran abundancia de *Aliivibrio* en los peces con distensión abdominal. Aunque también se pueden observar bacterias potencialmente

patógenas del género *Vibrio* en el intestino de los peces con y sin distensión abdominal. Las mucosas de piel, intestino y branquias están formadas por mucinas, las cuales son una barrera a la infección (Padra et al., 2019). Sin embargo, esta barrera puede ser sobrepasada. Un estudio determinó que la velocidad de adhesión a mucinas por parte de *A. hydrophila* y *A. salmonicida* es mucho mayor a la de otras bacterias como *Vibrio harvey* (Padra et al., 2019). A pesar de que la gran abundancia relativa de *A. wodanis* es evidente, las muestras sin distensión abdominal no presentan este patógeno. Quizás la velocidad de colonización de las bacterias del género *Aeromonas* superen a *A. wodanis*, actuando como un patógeno primario; para luego ser completamente desplazado por la infección de *A. wodanis*. Más estudios son necesarios para determinar si hay una relación entre la colonización de *Aeromonas* en los peces sin distensión con respecto a la colonización de *A. wodanis* en los peces con distensión abdominal. Sin embargo, *A. wodanis* ha sido frecuentemente aislado en co-ocurrencia con *Moritella viscosa* en peces con la enfermedad de úlcera de invierno, pero no se asocia con la patogenia primaria (Karlsen et al., 2014). Curiosamente, se ha descubierto que el crecimiento de *A. wodanis* impide el crecimiento de *M. viscosa* en un co-cultivo (Hjerde et al., 2015). En nuestras muestras, la sintomatología clínica no se condice a lo encontrado en literatura para úlceras de invierno (Lunder et al., 1995). *A. wodanis* podría estar oculto en alguna biopelícula del sistema, puesto que luego fue encontrado en la salida del biofiltro (Z200). En general, la biopelícula forma parte inherente del RAS en diferentes sitios, cuya comunidad se vuelve más estable a través del tiempo (Bakke et al., 2017). Sin embargo, luego de un brote el patógeno involucrado puede esconderse en una ella. Si estos potenciales patógenos se

desprenden de la biopelícula y pasa a ser de vida libre en la columna de agua, podrían ocasionar un nuevo brote (King et al., 2004). Por otro lado, *S. putrefaciens* ha sido identificada en peces de agua dulce enfermos (Pekala et al., 2015). Además, ha sido responsable de enfermedades en *Oreochromis niloticus*, *Micropterus salmoides*, *Cyprinus carpio L.* y *Oncorhynchus mykiss* (Jiang et al., 2022; Pazdzior et al., 2019; Sood et al., 2020). En general, determinar como afectan los cambios físicos realizados al RAS nos permite evaluar los potenciales patógenos oportunistas que se desarrollan para generar medidas de protección y tratamiento. Por ejemplo, una disminución en la temperatura de un RAS genera que la incidencia a enfermedades infecciosas aumente en un 75 % (Sergaliev et al., 2021). Al estudiar la microbiota antes y después del cambio en ese estudio se lograron identificar microorganismos claves, como *Pseudomonas*. Las cuales no eran una microbiota dominante previo al cambio de condición. Por otro lado, fue posible identificar en nuestras muestras de intestino bacterias de importancia en inocuidad alimentaria como *Clostridium sp.*, *Aeromonas hydrophila* y *Plesiomonas shigelloides*. Si bien estos microorganismos forman parte del intestino de los peces, en concentraciones elevadas pueden causar problemas gastrointestinales en los consumidores finales (Sheng and Wang, 2021).

La identificación de las funciones centrales del microbioma es esencial para nuestra capacidad de utilizar los beneficios de un microbioma saludable para nuestra ventaja en el cultivo de peces, así como para obtener una comprensión más profunda de los roles bacterianos (Tarnecki et al., 2017). Parece ser que una gran parte análisis funcional de la microbiota en intestino de los peces en agua dulce están relacionadas a “Carbohydrate Metabolisms”, “Amino Acid metabolism”, “TCA

cycle”, “Lipid Biosynthesis”, “Fatty Acid Biosynthesis” y “oxidative phosphorylation” en muestras de intestino en salmón del Atlántico (Dehler et al., 2017; Lorgen-Ritchie et al., 2021). En general, las vías de metabolismo de aminoácidos destacan en estudios de intestino en peces (Huang et al., 2020). En este caso, el metabolismo de aminoácidos se ve enriquecido en la microbiota de los peces sin distensión abdominal. Valina, leucina e isoleucina son metabolitos esenciales en los peces y juegan un rol en metabolismo energético (Roques et al., 2018). Estos están presentes en nuestros análisis y están más representados en los peces sin distensión abdominal. Además, los procesos de fermentación se encuentran más representados por la microbiota de los peces sin distensión abdominal. Clase que está representada en su mayoría por procesos de fermentación de ácidos grasos de cadena corta. Para la producción de este tipo de ácidos grasos es fundamental la participación de la microbiota intestinal de los peces y está relacionado con una mejor salud (Huyben et al., 2020; Kihara and Sakata, 1997). Otro *pathway* con gran diferencia entre proporciones, pero baja contribución es “Aromatic Compound Degradation” favoreciendo a los peces sin distensión abdominal. El cual, en piel y branquia se ha asociado a disbiosis (Lorgen-Ritchie et al.). Por otro lado, en las muestras de agua de cultivo de peces en estanques, se observa que este tipo de *pathway* está dentro de los mayoritarios (Zhang et al., 2022). En nuestras muestras de agua la contribución es baja y mayoritaria en el decantador. Sin embargo, en el análisis funcional general, en las muestras de agua dentro del sistema las diferencias entre proporciones son bajas. Lo que nos muestra que, en términos de funcionalidad, el aporte de la microbiota de las muestras de agua del RAS se mantiene a pesar de la diversidad a nivel de género encontrada.

Referente al metabolismo de compuestos inorgánicos, el hecho de que las muestras de intestino de peces con distensión abdominal la vía funcional del metabolismo de metabolismo del sulfuro es relevante. Por un lado, en el intestino es común la producción de H₂S por parte de las células epiteliales del huésped y el azufre metabolizado por la microbiota (Barton et al., 2017; Walsh and Giedroc, 2020). Sin embargo, dentro del hospedador el H₂S juega otro papel importante para las bacterias. Es capaz de protegerlas de los factores estresantes, actuando como un citoprotector que constituye un sistema de defensa contra los antibióticos y el estrés oxidativo (Pal et al., 2018; Shatalin et al., 2011; Walsh and Giedroc, 2020). Esto trae como consecuencia que un brote epidémico sea a un más difícil de tratar. Este es el caso de *A. wodanis*, que sería el principal productor de H₂S en el intestino de los peces con distensión abdominal según los datos entregados por PICRUST2. Por otro lado, la producción de sulfuro de hidrogeno se ha convertido en un problema emergente en RAS (Rojas-Tirado et al., 2021). A pesar de que puede presentarse naturalmente en el agua (Abdollahi and Hosseini, 2014). Resulta que los desechos sólidos al asentarse en los tanques producen H₂S a concentraciones bajas pero constantes, lo que podría producir una exposición crónica de los peces (Rojas-Tirado et al., 2021). Contrario a lo que se podría pensar, los filtros para disminuir la turbidez no son suficientes para reducir la cantidad de bacterias productoras de H₂S (Fossmark et al., 2020). Un proceso microbiano llamado reducción disimilatoria de sulfato es el principal proceso de producción de H₂S (Rojas-Tirado et al., 2021). El cual no fue detectado en este estudio. Además, existe otra vía llamada trans-sulfuración (Barton et al.; Pal et al.). La cual en MetaCyc sólo figura en términos de reacción de sus enzimas principales. Por lo que, una mezcla

entre en uso de la base de datos de KEGG y MetaCyc es útil para realizar comparaciones. Por un lado, KEGG contiene más compuestos que MetaCyc. Por otro lado, MetaCyc contiene más reacciones y vías funcionales que KEGG (Altman et al.).

Por otro lado, la acumulación de nitrato a pesar de ser solucionada por los biofiltros. La calidad de agua y condiciones de salinidad pueden afectar su funcionamiento (Blancheton et al., 2013). Dicha modificación puede ocasiona, por ejemplo, una mayor proporción de bacterias oxidantes de amoniacó en comparación a las bacterias oxidantes de nitrito (*nitrate*) generando una acumulación de este último. Lo que también es tóxico para los peces (Chen et al., 2006). En salmónidos como coho y trucha arcoíris, causa una reducción en la sobrevivencia y crecimiento (Baker et al., 2022). Entre las bacterias asociadas a la fijación de nitrógeno que encontramos en la columna de agua de nuestro estudio se destacan las familias *Pseudomonadaceae*, *Rhizobiaceae*, *Rhodobacteraceae*. Familias que han sido encontradas en otros estudios (Rojas-Tirado et al., 2021). Finalmente, el hecho de que ciertas vías se encuentren incompletas en el metabolismo del nitrógeno coincide con que dichas vías se desarrollan en el sedimento y no en la columna de agua (Preena et al., 2021).

Conclusiones

La tecnología de nanoporos es una herramienta poderosa para el *screening* de bacterias potencialmente patógenas o causantes de un brote de enfermedad en RAS. Igualmente es útil para el análisis de funcionalidad dentro de la microbiota. En

donde la microbiota de los peces sin distensión abdominal poseen una mayor contribución en los pathway relacionados con metabolismo de aminoácidos y fermentación de ácidos grasos de cadena corta, lo que es indicativo de una mejor salud. El estudio del metabolismo de compuestos inorgánicos en el microbiota del RAS nos entrega información sobre el estado de salud. Tanto en las muestras de intestino como en las muestras de agua. *Proteobacteria* son dominantes en el sistema, sobre todo en los peces con distensión abdominal. *Aliivibrio wodanis* es el principal patógeno presente en los peces con distensión abdominal y el probable agente etiológico de los peces enfermos.

Referencias

- Abdollahi, M., Hosseini, A., 2014. Hydrogen sulfide, in: Encyclopedia of toxicology. pp. 971-974.
- Ahmed, N., Turchini, G.M., 2021. Recirculating aquaculture systems (ras): Environmental solution and climate change adaptation. Journal of Cleaner Production, 297. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126604>
- Almeida, D.B., Magalhães, C., Sousa, Z., Borges, M.T., Silva, E., Blanquet, I., Mucha, A.P., 2021. Microbial community dynamics in a hatchery recirculating aquaculture system (ras) of sole (*solea senegalensis*). Aquaculture, 539. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736592>
- Altman, T., Travers, M., Kothari, A., Caspi, R., Karp, P.D., 2013. A systematic comparison of the metacyc and kegg pathway databases. BMC Bioinformatics, 14(1), 112. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-112>

- Åtland, Å., Rojas-Tirado, P., Stenberg, S.K., 2020. Water quality, in: Sommerset, I., Walde, C.S., Bang Jensen, B., Bornø, B., Haukaas, A., Brun, E. (Eds.), The health situation in norwegian aquaculture 2019. The Norwegian Veterinary Institute 2020, pp. 112-115.
- Attramadal, K.J.K., Truong, T.M.H., Bakke, I., Skjermo, J., Olsen, Y., Vadstein, O., 2014. Ras and microbial maturation as tools for k-selection of microbial communities improve survival in cod larvae. *Aquaculture*, 432, 483-490. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.052>
- Austin, B., Austin, D.A., 2016. in: Springer (Ed.), *Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish*. Springer, Cham.
- Baker, J.A., Matheson, G., Gilron, G., DeForest, D.K., 2022. Evaluation of sublethal toxicity of nitrite to a suite of aquatic organisms in support of the derivation of a chronic environmental water quality benchmark. *Arch Environ Contam Toxicol*, 83(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00244-022-00941-8>
- Bakke, I., Åm, A.L., Kolarevic, J., Ytrestøyl, T., Vadstein, O., Attramadal, K.J.K., Terjesen, B.F., 2017. Microbial community dynamics in semi-commercial ras for production of atlantic salmon post-smolts at different salinities. *Aquacultural Engineering*, 78, 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2016.10.002>
- Barton, L.L., Ritz, N.L., Fauque, G.D., Lin, H.C., 2017. Sulfur cycling and the intestinal microbiome. *Dig Dis Sci*, 62(9), 2241-2257. <https://doi.org/10.1007/s10620-017-4689-5>
- Bauer, J., Teitge, F., Neffe, L., Adamek, M., Jung, A., Peppler, C., Steinhagen, D., Jung-Schroers, V., 2021. Impact of a reduced water salinity on the composition of *vibrio* spp. In recirculating aquaculture systems for pacific white shrimp (*litopenaeus vannamei*) and its possible risks for shrimp health and food safety. *J Fish Dis*, 44(1), 89-105. <https://doi.org/10.1111/jfd.13270>

- Bertolotti, A.C., Layer, R.M., Gundappa, M.K., Gallagher, M.D., Pehlivanoglu, E., Nome, T., Robledo, D., Kent, M.P., Røsæg, L.L., Holen, M.M., Mulugeta, T.D., Ashton, T.J., Hindar, K., Sægrov, H., Florø-Larsen, B., Erkinaro, J., Primmer, C.R., Bernatchez, L., Martin, S.A.M., Johnston, I.A., Sandve, S.R., Lien, S., Macqueen, D.J., 2020. The structural variation landscape in 492 atlantic salmon genomes. 10.1101/2020.05.16.099614. <https://doi.org/10.1101/2020.05.16.099614>
- Blancheton, J.P., Attramadal, K.J.K., Michaud, L., d'Orbcastel, E.R., Vadstein, O., 2013. Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication. *Aquacultural Engineering*, 53, 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.11.009>
- Caspi, R., Billington, R., Fulcher, C.A., Keseler, I.M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Midford, P.E., Ong, Q., Ong, W.K., Paley, S., Subhraveti, P., Karp, P.D., 2018. The metacyc database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D633-D639. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx935>
- Chen, S., Ling, J., Blancheton, J.-P., 2006. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 179-197. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.09.004>
- Cusco, A., Catozzi, C., Vines, J., Sanchez, A., Francino, O., 2018. Microbiota profiling with long amplicons using nanopore sequencing: Full-length 16s rna gene and the 16s-its-23s of the rrn operon. *F1000Res*, 7, 1755. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16817.2>
- d'Orbcastel, E.R., Blancheton, J.-P., Aubin, J., 2009. Towards environmentally sustainable aquaculture: Comparison between two trout farming systems using life cycle assessment. *Aquacultural Engineering*, 40(3), 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2008.12.002>

- Dehler, C.E., Secombes, C.J., Martin, S.A.M., 2017. Seawater transfer alters the intestinal microbiota profiles of atlantic salmon (*salmo salar* L.). Scientific Reports, 7(1), 13877. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13249-8>
- Delamare-Deboutteville, J., Taengphu, S., Gan, H.M., Kayansamruaj, P., Debnath, P.P., Barnes, A., Wilkinson, S., Kawasaki, M., Vishnumurthy Mohan, C., Senapin, S., Dong, H.T., 2021. Rapid genotyping of tilapia lake virus (tilv) using nanopore sequencing. J Fish Dis, 44(10), 1491-1502. <https://doi.org/10.1111/jfd.13467>
- Dixon, P., 2003. Vegan, a package of r functions for community ecology. Journal of Vegetation Science, 14(6), 927-930. <https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x>
- Douglas, G.M., Maffei, V.J., Zaneveld, J.R., Yurgel, S.N., Brown, J.R., Taylor, C.M., Huttenhower, C., Langille, M.G.I., 2020. Picrust2 for prediction of metagenome functions. Nature Biotechnology, 38(6), 685-688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Du, X., Bayliss, S.C., Feil, E.J., Liu, Y., Wang, C., Zhang, G., Zhou, D., Wei, D., Tang, N., Leclercq, S.O., Feng, J., 2019. Real time monitoring of *aeromonas salmonicida* evolution in response to successive antibiotic therapies in a commercial fish farm. Environ Microbiol, 21(3), 1113-1123. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14531>
- Fossmark, R.O., Attramadal, K.J.K., Nordøy, K., Østerhus, S.W., Vadstein, O., 2021. A comparison of two seawater adaptation strategies for atlantic salmon post-smolt (*salmo salar*) grown in recirculating aquaculture systems (ras): Nitrification, water and gut microbiota, and performance of fish. Aquaculture, 532. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735973>
- Fossmark, R.O., Vadstein, O., Rosten, T.W., Bakke, I., Košeto, D., Bugten, A.V., Helberg, G.A., Nesje, J., Jørgensen, N.O.G., Raspati, G., Azrague, K., Østerhus, S.W., Attramadal, K.J.K., 2020. Effects of reduced organic matter

loading through membrane filtration on the microbial community dynamics in recirculating aquaculture systems (ras) with atlantic salmon parr (*salmo salar*). *Aquaculture*, 524. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735268>

Fujiyoshi, S., Muto-Fujita, A., Maruyama, F., 2020. Evaluation of pcr conditions for characterizing bacterial communities with full-length 16s rrna genes using a portable nanopore sequencer. *Scientific Reports*, 10(1), 12580. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69450-9>

Gajardo, K., Rodiles, A., Kortner, T.M., Krogdahl, Å., Bakke, A.M., Merrifield, D.L., Sørum, H., 2016. A high-resolution map of the gut microbiota in atlantic salmon (*salmo salar*): A basis for comparative gut microbial research. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep30893>

Gallagher, M.D., Matejusova, I., Nguyen, L., Ruane, N.M., Falk, K., Macqueen, D.J., 2018. Nanopore sequencing for rapid diagnostics of salmonid rna viruses. *Sci Rep*, 8(1), 16307. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34464-x>

Gonçalves, A.T., Collipal-Matamal, R., Valenzuela-Muñoz, V., Nuñez-Acuña, G., Valenzuela-Miranda, D., Gallardo-Escárte, C., 2020. Nanopore sequencing of microbial communities reveals the potential role of sea lice as a reservoir for fish pathogens. *Scientific Reports*, 10(1), 2895. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59747-0>

Hjerde, E., Karlsen, C., Sorum, H., Parkhill, J., Willassen, N.P., Thomson, N.R., 2015. Co-cultivation and transcriptome sequencing of two co-existing fish pathogens *moritella viscosa* and *aliivibrio wodanis*. *BMC Genomics*, 16, 447. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1669-z>

Huang, Q., Sham, R.C., Deng, Y., Mao, Y., Wang, C., Zhang, T., Leung, K.M.Y., 2020. Diversity of gut microbiomes in marine fishes is shaped by host-related factors. *Mol Ecol*, 29(24), 5019-5034. <https://doi.org/10.1111/mec.15699>

- Huyben, D., Roehe, B.K., Bekaert, M., Ruyter, B., Glencross, B., 2020. Dietary lipid:Protein ratio and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids alters the gut microbiome of atlantic salmon under hypoxic and normoxic conditions. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.589898>
- Jeong, J., Yun, K., Mun, S., Chung, W.H., Choi, S.Y., Nam, Y.D., Lim, M.Y., Hong, C.P., Park, C., Ahn, Y.J., Han, K., 2021. The effect of taxonomic classification by full-length 16s rna sequencing with a synthetic long-read technology. *Sci Rep*, 11(1), 1727. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80826-9>
- Jiang, X., Wang, X., Li, L., Niu, C., Pei, C., Zhu, L., Kong, X., 2022. Identification of *shewanella putrefaciens* as a novel pathogen of the largemouth bass (*micropterus salmoides*) and histopathological analysis of diseased fish. *Front Cell Infect Microbiol*, 12, 1042977. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1042977>
- Johnson, J.S., Spakowicz, D.J., Hong, B.Y., Petersen, L.M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S.R., Hanson, B.M., Agresta, H.O., Gerstein, M., Sodergren, E., Weinstock, G.M., 2019. Evaluation of 16s rna gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun*, 10(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Kanehisa, M., Sato, Y., 2020. Kegg mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Sci*, 29(1), 28-35. <https://doi.org/10.1002/pro.3711>
- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., 2022. Kegg mapping tools for uncovering hidden features in biological data. *Protein Sci*, 31(1), 47-53. <https://doi.org/10.1002/pro.4172>
- Karlsen, C., Ottem, K.F., Brevik, O.J., Davey, M., Sorum, H., Winther-Larsen, H.C., 2017. The environmental and host-associated bacterial microbiota of arctic seawater-farmed atlantic salmon with ulcerative disorders. *J Fish Dis*, 40(11), 1645-1663. <https://doi.org/10.1111/jfd.12632>

- Karlsen, C., Vanberg, C., Mikkelsen, H., Sorum, H., 2014. Co-infection of atlantic salmon (*salmo salar*), by *moritella viscosa* and *aliivibrio wodanis*, development of disease and host colonization. *Vet Microbiol*, 171(1-2), 112-121. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.011>
- Kerrigan, Z., Kirkpatrick, J.B., D'Hondt, S., 2019. Influence of 16s rrna hypervariable region on estimates of bacterial diversity and community composition in seawater and marine sediment. *Front Microbiol*, 10, 1640. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01640>
- Kiemer, M.C.B., Black, K.D., Lussot, D., Bullock, A.M., Ezzi, I., 1995. The effects of chronic and acute exposure to hydrogen sulphide on atlantic salmon (*salmo salar* l.). *Aquaculture*, 135(4), 311-327. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01025-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01025-4)
- Kihara, M., Sakata, T., 1997. Fermentation of dietary carbohydrates to short-chain fatty acids by gut microbes and its influence on intestinal morphology of a detritivorous teleost tilapia (*oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 118(4), 1201-1207. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(97\)00052-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-9629(97)00052-2)
- Kim, P.S., Shin, N.R., Lee, J.B., Kim, M.S., Whon, T.W., Hyun, D.W., Yun, J.H., Jung, M.J., Kim, J.Y., Bae, J.W., 2021. Host habitat is the major determinant of the gut microbiome of fish. *Microbiome*, 9(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01113-x>
- King, R.K., Flick, G.J., Pierson, D., Smith, S.A., Boardman, G.D., Coale, C.W., 2004. Identification of bacterial pathogens in biofilms of recirculating aquaculture systems. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 13(1), 125-133. https://doi.org/10.1300/J030v13n01_11
- Kobiyama, A., Ikeo, K., Reza, M.S., Rashid, J., Yamada, Y., Ikeda, Y., Ikeda, D., Mizusawa, N., Sato, S., Ogata, T., Jimbo, M., Kudo, T., Kaga, S., Watanabe, S., Naiki, K., Kaga, Y., Mineta, K., Bajic, V., Gojobori, T., Watabe, S., 2018.

Metagenome-based diversity analyses suggest a strong locality signal for bacterial communities associated with oyster aquaculture farms in ofunato bay. *Gene*, 665, 149-154. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.073>

Lorgen-Ritchie, M., Clarkson, M., Chalmers, L., Taylor, J.F., Migaud, H., Martin, S.A.M., 2021. A temporally dynamic gut microbiome in atlantic salmon during freshwater recirculating aquaculture system (ras) production and post-seawater transfer. *Frontiers in Marine Science*, 8, 711797. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.711797>

Lorgen-Ritchie, M., Clarkson, M., Chalmers, L., Taylor, J.F., Migaud, H., Martin, S.A.M., 2022. Temporal changes in skin and gill microbiomes of atlantic salmon in a recirculating aquaculture system – why do they matter? *Aquaculture*, 558. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738352>

Low, L., Fuentes-Utrilla, P., Hodson, J., O'Neil, J.D., Rossiter, A.E., Begum, G., Suleiman, K., Murray, P.I., Wallace, G.R., Loman, N.J., Rauz, S., West Midlands Collaborative Ophthalmology Network for Clinical, E., Research by, T., 2021. Evaluation of full-length nanopore 16s sequencing for detection of pathogens in microbial keratitis. *PeerJ*, 9, e10778. <https://doi.org/10.7717/peerj.10778>

Lu, J., Zhang, Y., Wu, J., Luo, Y., 2019. Effects of microplastics on distribution of antibiotic resistance genes in recirculating aquaculture system. *Ecotoxicol Environ Saf*, 184, 109631. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109631>

Lunder, T., Evensen, Å., Holstad, G., Håfj stein, T., 1995. "Winter ulcer" in the atlantic salmon *salmo salar*. Pathological and bacteriological investigations and transmission experiments. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23(1), 39-49. <https://www.int-res.com/abstracts/dao/v23/n1/p39-49/>

Macqueen, D.J., Eve, O., Gundappa, M.K., Daniels, R.R., Gallagher, M.D., Alexandersen, S., Karlsen, M., 2021. Genomic epidemiology of salmonid alphavirus in norwegian aquaculture reveals recent subtype-2 transmission

- dynamics and novel subtype-3 lineages. *Viruses*, 13(12).
<https://doi.org/10.3390/v13122549>
- Minich, J.J., Petrus, S., Michael, J.D., Michael, T.P., Knight, R., Allen, E.E., 2020. Temporal, environmental, and biological drivers of the mucosal microbiome in a wild marine fish, scomber japonicus. *mSphere*, 5(3).
<https://doi.org/10.1128/mSphere.00401-20>
- Minich, J.J., Poore, G.D., Jantawongsri, K., Johnston, C., Bowie, K., Bowman, J., Knight, R., Nowak, B., Allen, E.E., 2020. Microbial ecology of atlantic salmon (*salmo salar*) hatcheries: Impacts of the built environment on fish mucosal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(12), e00411-00420.
<https://doi.org/doi:10.1128/AEM.00411-20>
- Morales-Rivera, M.F., Valenzuela-Miranda, D., Valenzuela-Muñoz, V., Nuñez-Acuña, G., Avendaño-Herrera, R., Gallardo-Escárate, C., 2022. Nanopore sequencing evidenced the presence of fish bacterial pathogens in the sea louse (*caligus rogercresseyi*) microbiota collected from distant salmon farms in chile. *Aquaculture*, 552. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738026>
- Moschos, S., Kormas, K.A., Karayanni, H., 2022. Prokaryotic diversity in marine and freshwater recirculating aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture*, 14(4), 1861-1886. <https://doi.org/10.1111/raq.12677>
- Nagpal, S., Haque, M.M., Singh, R., Mande, S.S., 2018. IviKodak-a platform and standard workflow for inferring, analyzing, comparing, and visualizing the functional potential of microbial communities. *Front Microbiol*, 9, 3336.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03336>
- Nygaard, A.B., Tunsjo, H.S., Meisal, R., Charnock, C., 2020. A preliminary study on the potential of nanopore minion and illumina miseq 16s rRNA gene sequencing to characterize building-dust microbiomes. *Sci Rep*, 10(1), 3209.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-59771-0>

- Ofek, T., Lalzar, M., Izhaki, I., Halpern, M., 2022. Intestine and spleen microbiota composition in healthy and diseased tilapia. *Anim Microbiome*, 4(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00201-z>
- Padra, J.T., Murugan, A.V.M., Sundell, K., Sundh, H., Benktander, J., Linden, S.K., 2019. Fish pathogen binding to mucins from atlantic salmon and arctic char differs in avidity and specificity and is modulated by fluid velocity. *PLoS One*, 14(5), e0215583. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215583>
- Pal, V.K., Bandyopadhyay, P., Singh, A., 2018. Hydrogen sulfide in physiology and pathogenesis of bacteria and viruses. *IUBMB Life*, 70(5), 393-410. <https://doi.org/10.1002/iub.1740>
- Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., Beiko, R.G., 2014. Stamp: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, 30(21), 3123-3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>
- Patil, P.K., Antony, L., Avunje, S., Viswanathan, B., Lalitha, N., Jangam, A.K., Kumar, D., Solanki, H.G., Reddy, M.A., Alavandi, S.V., Vijayan, K.K., 2021. Bioaugmentation with nitrifying and denitrifying microbial consortia for mitigation of nitrogenous metabolites in shrimp ponds. *Aquaculture*, 541. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736819>
- Pazdzior, E., Pekala-Safinska, A., Wasyl, D., 2019. Phenotypic diversity and potential virulence factors of the shewanella putrefaciens group isolated from freshwater fish. *J Vet Res*, 63(3), 321-332. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0046>
- Pekala, A., Kozinska, A., Pazdzior, E., Glowacka, H., 2015. Phenotypical and genotypical characterization of shewanella putrefaciens strains isolated from diseased freshwater fish. *J Fish Dis*, 38(3), 283-293. <https://doi.org/10.1111/jfd.12231>

- Preena, P.G., Rejish Kumar, V.J., Singh, I.S.B., 2021. Nitrification and denitrification in recirculating aquaculture systems: The processes and players. *Reviews in Aquaculture*, 13(4), 2053-2075. <https://doi.org/10.1111/raq.12558>
- R-Core-Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, vienna, austria., <https://www.R-project.org/>.
- Rojas-Tirado, P., Aalto, S.L., Åtland, Å., Letelier-Gordo, C., 2021. Biofilters are potential hotspots for h₂s production in brackish and marine water ras. *Aquaculture*, 536. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736490>
- Roques, S., Deborde, C., Richard, N., Skiba-Cassy, S., Moing, A., Fauconneau, B., 2018. Metabolomics and fish nutrition: A review in the context of sustainable feed development. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 261-282. <https://doi.org/10.1111/raq.12316>
- Schreier, H.J., Mirzoyan, N., Saito, K., 2010. Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems. *Curr Opin Biotechnol*, 21(3), 318-325. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.011>
- Sergaliev, N.K., Kakishev, M.G., Ginayatov, N.S., Nurzhanova, F.K., Andronov, E.E., 2021. Microbiome structure in a recirculating aquaculture system and its connection to infections in sturgeon fish. *Vet World*, 14(3), 661-668. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.661-668>
- Sernapesca, 2021. Informe sanitario con informacion sanitaria de agua dulce y mar año 2021. Departamento de Salud Animal. Subdirección de Acuicultura. Gobierno de Chile, <http://www.sernapesca.cl/informes/resultados-gestion.> .
- Shatalin, K., Shatalina, E., Mironov, A., Nudler, E., 2011. H₂s: A universal defense against antibiotics in bacteria. *Science*, 334(6058), 986-990. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1209855>

- Shen, W., Ren, H., 2021. Taxonkit: A practical and efficient ncbi taxonomy toolkit. *J Genet Genomics*, 48(9), 844-850. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.03.006>
- Sheng, L., Wang, L., 2021. The microbial safety of fish and fish products: Recent advances in understanding its significance, contamination sources, and control strategies. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 20(1), 738-786. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12671>
- Shephard, K.L., 1994. Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4(4), 401-429. <https://doi.org/10.1007/BF00042888>
- Sood, N., Pradhan, P.K., Ravindra, Verma, D.K., Yadav, M.K., Mishra, R.K., Kumar, U., Swaminathan, T.R., Sood, N.K., 2020. Large-scale mortality in cultured tilapia *oreochromis niloticus* due to infection with *shewanella putrefaciens* in india. *Journal of the World Aquaculture Society*, 51(2), 563-570. <https://doi.org/10.1111/jwas.12686>
- Sperling, J.L., Silva-Brandão, K.L., Brandão, M.M., Lloyd, V.K., Dang, S., Davis, C.S., Sperling, F.A.H., Magor, K.E., 2017. Comparison of bacterial 16s rna variable regions for microbiome surveys of ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 8(4), 453-461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.002>
- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X., Song, W., 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*oryza sativa* l.) roots estimated by 16s rdna sequence analysis. *Microb Ecol*, 55(3), 415-424. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9287-1>
- Tarnecki, A.M., Burgos, F.A., Ray, C.L., Arias, C.R., 2017. Fish intestinal microbiome: Diversity and symbiosis unravelled by metagenomics. *J Appl Microbiol*, 123(1), 2-17. <https://doi.org/10.1111/jam.13415>
- Vadstein, O., Attramadal, K.J.K., Bakke, I., Olsen, Y., 2018. K-selection as microbial community management strategy: A method for improved viability of larvae in

- aquaculture. Front Microbiol, 9, 2730.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02730>
- Valdes, A.M., Walter, J., Segal, E., Spector, T.D., 2018. Role of the gut microbiota in nutrition and health. BMJ, 361, k2179. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>
- Walsh, B.J.C., Giedroc, D.P., 2020. H₂S and reactive sulfur signaling at the host-bacterial pathogen interface. J Biol Chem, 295(38), 13150-13168. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.011304>
- Wang, J., Jaramillo-Torres, A., Li, Y., Kortner, T.M., Gajardo, K., Brevik, O.J., Jakobsen, J.V., Krogdahl, A., 2021. Microbiota in intestinal digesta of atlantic salmon (*salmo salar*), observed from late freshwater stage until one year in seawater, and effects of functional ingredients: A case study from a commercial sized research site in the arctic region. Animal Microbiome, 3(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00075-7>
- Yadav, S., Kapley, A., 2019. Exploration of activated sludge resistome using metagenomics. Sci Total Environ, 692, 1155-1164. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.267>
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glockner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R., Rossello-Mora, R., 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16s rna gene sequences. Nat Rev Microbiol, 12(9), 635-645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Yogev, U., Gross, A., 2019. Reducing environmental impact of recirculating aquaculture systems by introducing a novel microaerophilic assimilation reactor: Modeling and proof of concept. Journal of Cleaner Production, 226, 1042-1050. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.003>
- Zhang, X., You, Y., Peng, F., Tang, X., Zhou, Y., Liu, J., Lin, D., Zhou, Y., 2022. Interaction of microbiota between fish and the environment of an in-pond

Material Suplementario

Tabla S1. List of fish pathogens (Austin and Austin ,2016)

	Genus	Specie	Taxid		Genus	Specie	Taxid
1	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	40214	63	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	549
2	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	28090	64	<i>Pasteurella</i>	<i>Pasteurella piscicida</i>	38294
3	<i>Aerococcus</i>	<i>Aerococcus viridans</i>	1377	65	<i>Pasteurella</i>	<i>Pasteurella skyensis</i>	97481
4	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	656	66	<i>Photobacterium</i>	<i>Photobacterium damsela</i>	38293
5	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas bestiarum</i>	105751	67	<i>Piscirickettsia</i>	<i>Piscirickettsia salmonis</i>	1238
6	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	648	68	<i>Plesiomonas</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	703
7	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas dhakensis</i>	196024	69	<i>Providencia</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	587
8	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	644	70	<i>Providencia</i>	<i>Providencia vermicola</i>	333965
9	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas jandaei</i>	650	71	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	43662
10	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	645	72	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas undina</i>	43660
11	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	646	73	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	287
12	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas veronii</i>	654	74	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	43263
13	<i>Aliivibrio</i>	<i>Aliivibrio logei</i>	688	75	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	53406
14	<i>Aliivibrio</i>	<i>Aliivibrio salmonicida</i>	40269	76	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas baetica</i>	674054
15	<i>Aliivibrio</i>	<i>Aliivibrio wodanis</i>	80852	77	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	587753
16	<i>Aliivibrio</i>	<i>Aliivibrio fischeri</i>	668	78	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	294
17	<i>Aquaspirillum</i>	<i>Aquaspirillum</i> sp	1872580	79	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i>	198620
18	<i>Arcobacter</i>	<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	28198	80	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas luteola</i>	47886
19	<i>Carnobacterium</i>	<i>Carnobacterium piscicola</i>	1255596	81	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas mossellii</i>	78327
20	<i>Chlamydia</i>	<i>Chlamydia</i>	810	82	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	70775
21	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Chryseobacterium aahli</i>	1278643	83	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	301
22	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	546	84	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	303
23	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium botulinum</i>	1491	85	<i>Renibacterium</i>	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	1646
24	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium tarantellae</i>	39493	85	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella enterica</i>	28901
25	<i>Delftia</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	80866	87	<i>Serratia</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	614
26	<i>Edwardsiella</i>	<i>Edwardsiella anguillarum</i>	1821960	88	<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>	615
27	<i>Edwardsiella</i>	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	67780	89	<i>Serratia</i>	<i>Serratia plymuthica</i>	82996
28	<i>Edwardsiella</i>	<i>Edwardsiella piscicida</i>	1263550	90	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>	24
29	<i>Edwardsiella</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	636	91	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	40324
30	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	550	92	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1311
31	<i>Erysipelothrix</i>	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	1648	93	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1334
32	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia vulneris</i>	566	94	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus ictaluri</i>	380397
33	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	55197	95	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus iniae</i>	1346
34	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium columnare</i>	996	96	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus milleri</i>	33040
35	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium hydatis</i>	991	97	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus parauberis</i>	1334
36	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	986	98	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus phocae</i>	119224
37	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium oncorhynchi</i>	728056	99	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum dicentrarchi</i>	669041
38	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium piscicida</i>	43662	100	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum discolor</i>	361581
39	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	96345	101	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum finnmarkense</i>	1680763
40	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i> sp	239	102	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum gallaicum</i>	561505
41	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium spartansii</i>	1278819	103	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	107401
42	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium succinicans</i>	29536	104	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum ovolyticum</i>	104270
43	<i>Flectobacillus</i>	<i>Flectobacillus roseus</i>	502259	105	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum soleae</i>	447689
44	<i>Francisella</i>	<i>Francisella noatunensis</i>	657445	106	<i>Vagococcus</i>	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	2739
45	<i>Francisella</i>	<i>Francisella</i> sp	2047875	107	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio aestuarianus</i>	28171
46	<i>Hafnia</i>	<i>Hafnia alvei</i>	569	108	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	663
47	<i>Hahella</i>	<i>Hahella chejuensis</i>	158327	109	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	55601
48	<i>Halomonas</i>	<i>Halomonas cupida</i>	44933	110	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	666
49	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Janthinobacterium lividum</i>	29581	111	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio furnissii</i>	29494
50	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	573	112	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	669
51	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus garvieae</i>	1363	113	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio ichthyenteri</i>	142461
52	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	1358	114	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio mimicus</i>	674
53	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus piscium</i>	1364	115	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio ordalii</i>	28174
54	<i>Moritella</i>	<i>Moritella marina</i>	90736	116	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	670
55	<i>Moritella</i>	<i>Moritella viscosa</i>	80854	117	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio ponticus</i>	265668
56	<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	1766	118	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio scophthalmi</i>	45658
57	<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>	1781	119	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio splendidus</i>	29497
58	<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium</i> sp.	1763	120	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio tapetis</i>	52443
59	<i>Mycoplasma</i>	<i>Mycoplasma mobile</i>	2118	121	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	672
60	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	1824	122	<i>Weissella</i>	<i>Weissella ceti</i>	759620
61	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia crassostreae</i>	53428	123	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia intermedia</i>	631
62	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia seriolae</i>	37332	124	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	29486

Tabla S2. Sequencing data.

Sample	Raw reads	After length filter	Avg Quality	Avg length	Classified (%)	Avg. Accuracy (%)	Reads Ica=0 (%)	Reads Ica =1 (%)
Boca	186.403	4.074	9,37	1.361	95	85	64	36
Deca	65.438	14.402	9,85	1.325	94	84	48	52
z100	30.418	13.291	10,36	1.356	96	86	36	64
z200	304.153	7.783	9,88	1.319	93	84	56	44
BL	53.715	17.891	10,32	1.392	96	88	87	13
No_ BL1	243.985	4.634	9,52	1.370	96	85	75	25
No_ BL2	234.102	27.668	10,29	1.371	94	87	63	37
Total	1.118.214	89.743	9,94	1.356	95	86	62	38

Water samples: intake (Boca), decanter (Deca), biofilter in (Z100), biofilter out (Z200); fish samples: Bloating fish (BL) and no bloating fish (no_BL1 and no_BL2).

Tabla S3. Complete taxa list of reads on RAS.

<https://doi.org/10.5281/zenodo.7708819>

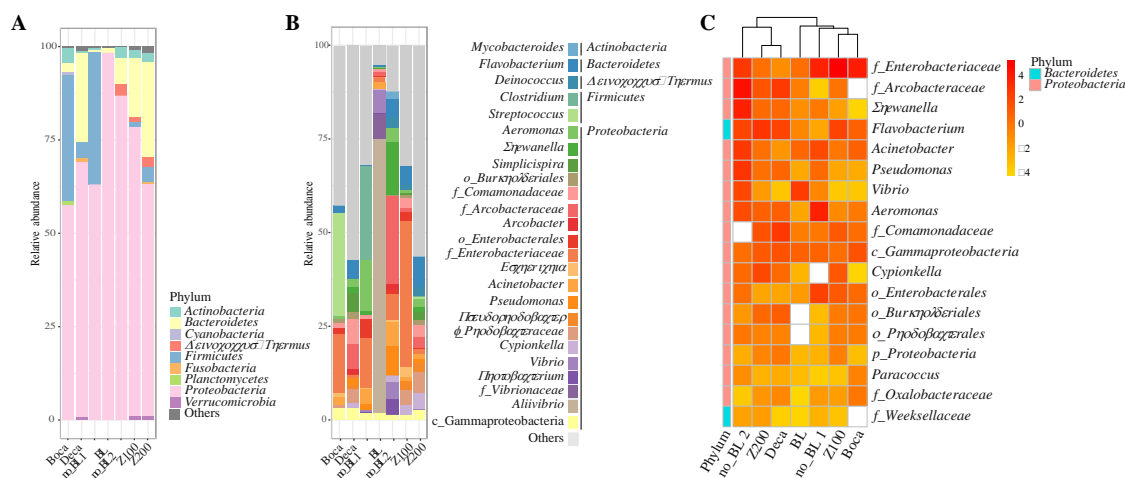


Figure S1. Relative abundance of microbiota composition of RAS system. Bloating (BL) and no bloating (no_BL1 and no_BL2) Atlantic salmon intestinal microbiota and water samples intake (Boca), decanter (Deca), biofilter in (Z100) and biofilter out (Z200). **A.** Microbiota abundance at the phylum level. **B.** Top 25 most abundant taxa at genus level. **C.** Heat map of normalized relative abundance core microbiota at the genus level.

Tabla S4. Functional prediction of microbiome in RAS

<https://doi.org/10.5281/zenodo.7708819>

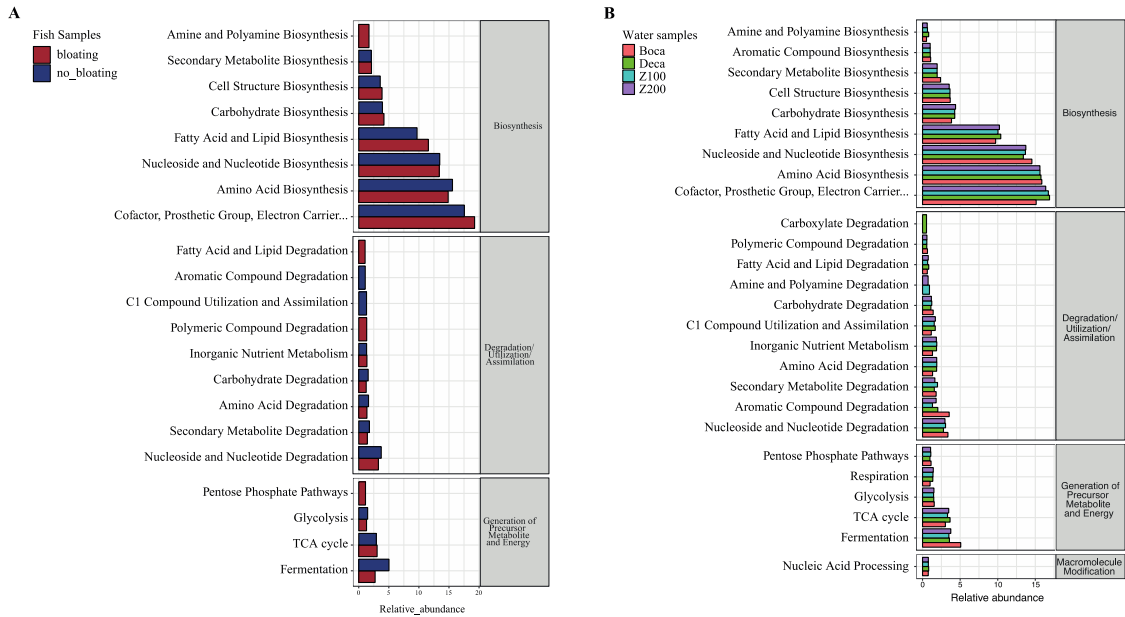


Figure S2. Functional analysis of the microbial metagenome of water samples. PICRUSt2 inferred metabolic MetaCyc pathway (sec level) with an abundance relative filter of 0.5. **A.** Bloating (BL) and no bloating (no_BL) Atlantic salmon intestinal microbiota. **B.** Water samples intake (Boca), decanter (Deca), biofilter in (Z100) and biofilter out (Z200).

Tabla S5. Functional prediction of microbiome in RAS KEGG terms.

<https://doi.org/10.5281/zenodo.7708819>

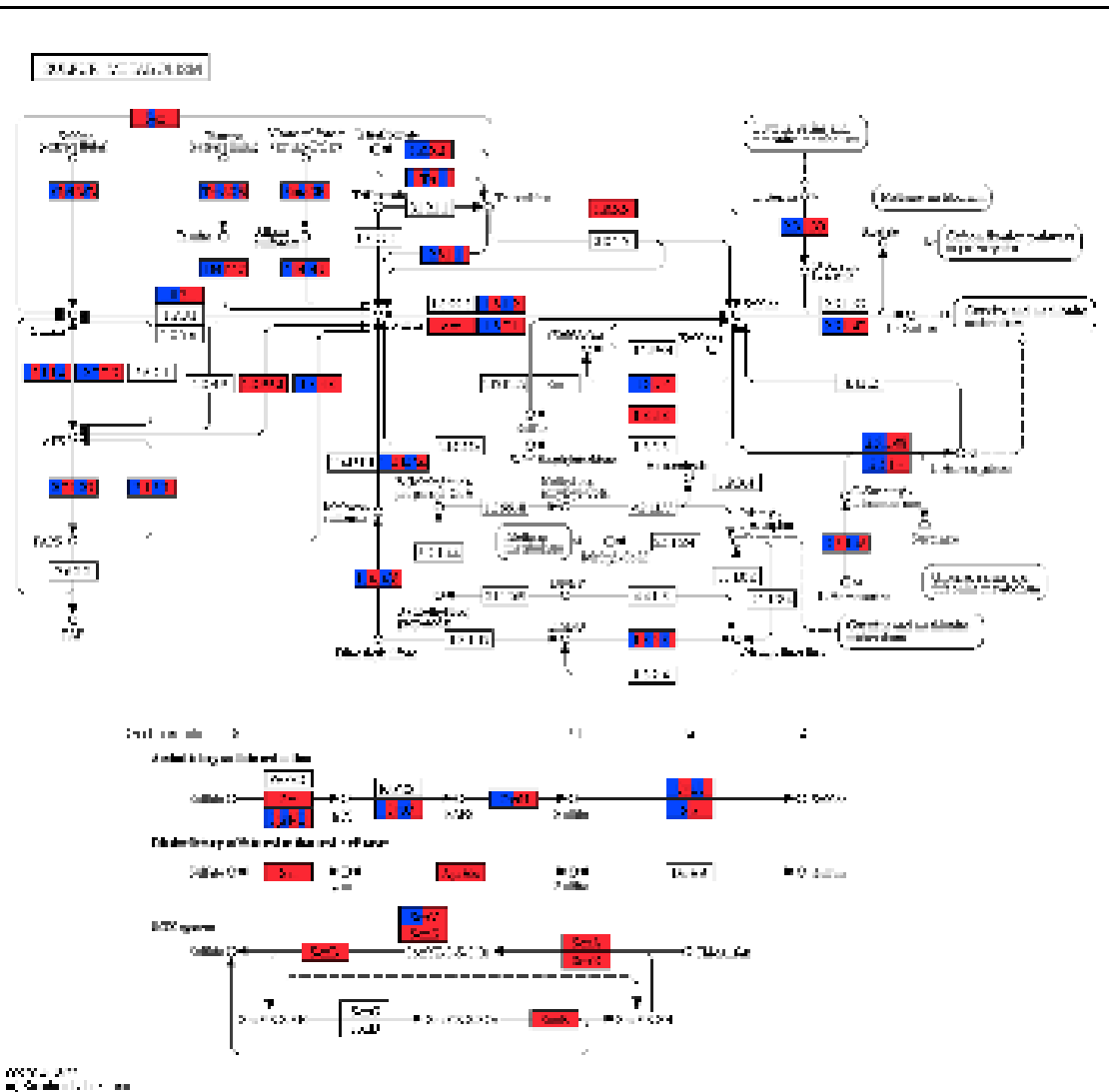


Figure S3A. KEGG pathway map of sulfur and nitrogen metabolism. Bloating (BL) and no bloating (no_BL) sulfur metabolism map of Atlantic salmon intestinal microbiota.

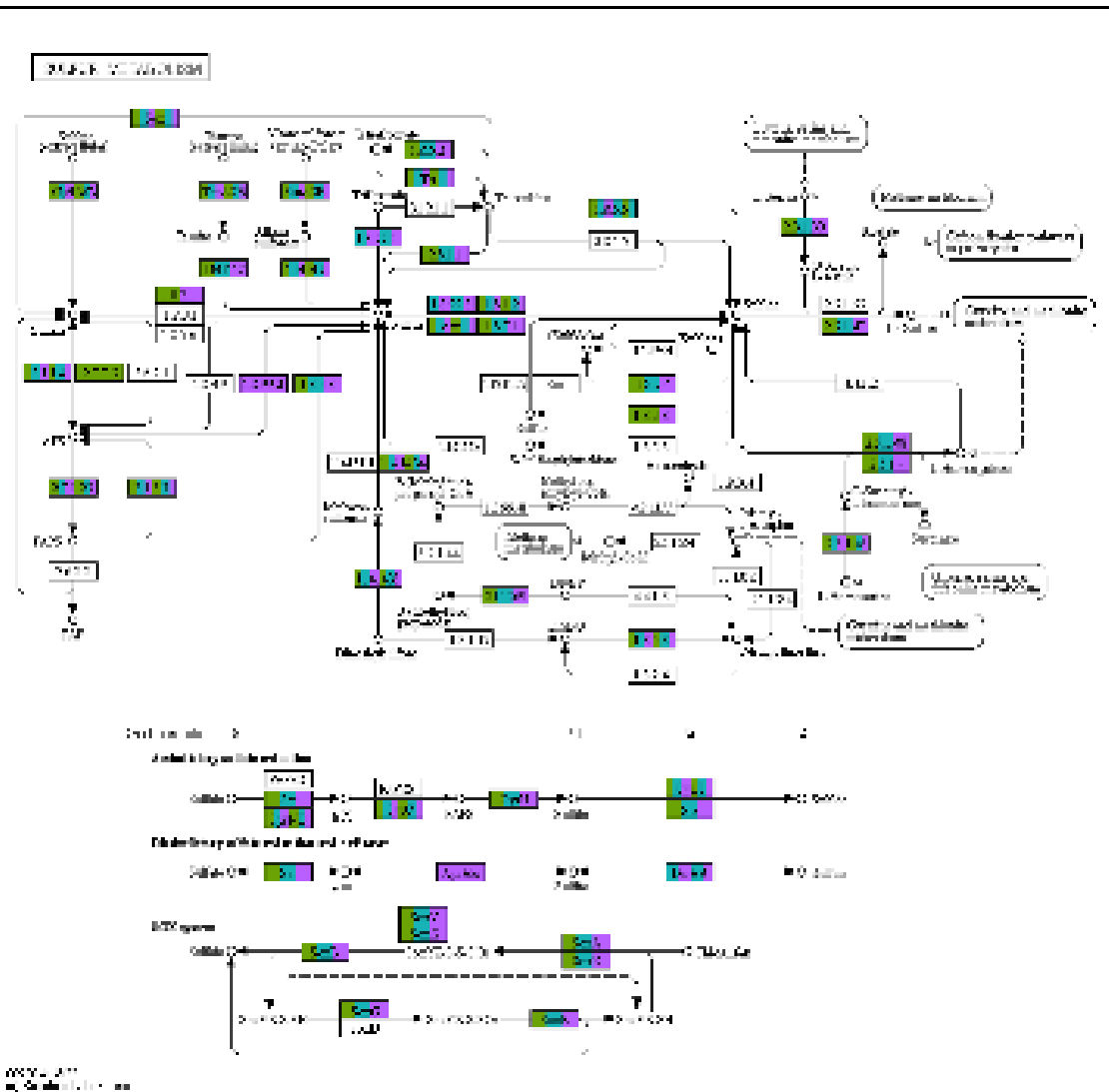


Figure S3C. KEGG pathway map of sulfur and nitrogen metabolism. Nitrogen metabolism map of Intake (Boca), decanter (Deca), biofilter in (Z100) and biofilter out (Z200) water samples of RAS system.

Anexo capítulo IV

Tabla A1. Tabla de abundancia KOs (KEGG Orthology) totales y KOs de virulencia, obtenida mediante PICRUSt2 de muestras de agua y muestras de intestino de peces en RAS con problemas de mortalidad posterior a un evento de vacunación. Factores de virulencia filtrados a partir de la base de datos generada por Pattaroni *et al.* (Pattaroni et al.).

Muestra	Número total de KOs	Abundancia total de KOs	Número de KOs de virulencia	Abundancia de KOs de virulencia
BL	5431	14863145	490	2784793
no_BL1	5641	4862821	489	908382
no_BL2	5882	21867112	532	3677637
Boca	6096	2034593	501	318851
Deca	6376	7227897	511	1210501
Z100	6505	5434036	524	765114
Z200	6304	4882193	546	737188
Total KOs	6785	NC	546	NC

BL: grupo de peces con distensión abdominal; no_BL1 y no_BL2; grupo de peces sin distensión abdominal; Boca : bocatoma; Deca: Decantador; Z100: entrada biofiltro; Z200: salida biofiltro; NC: No corresponde.

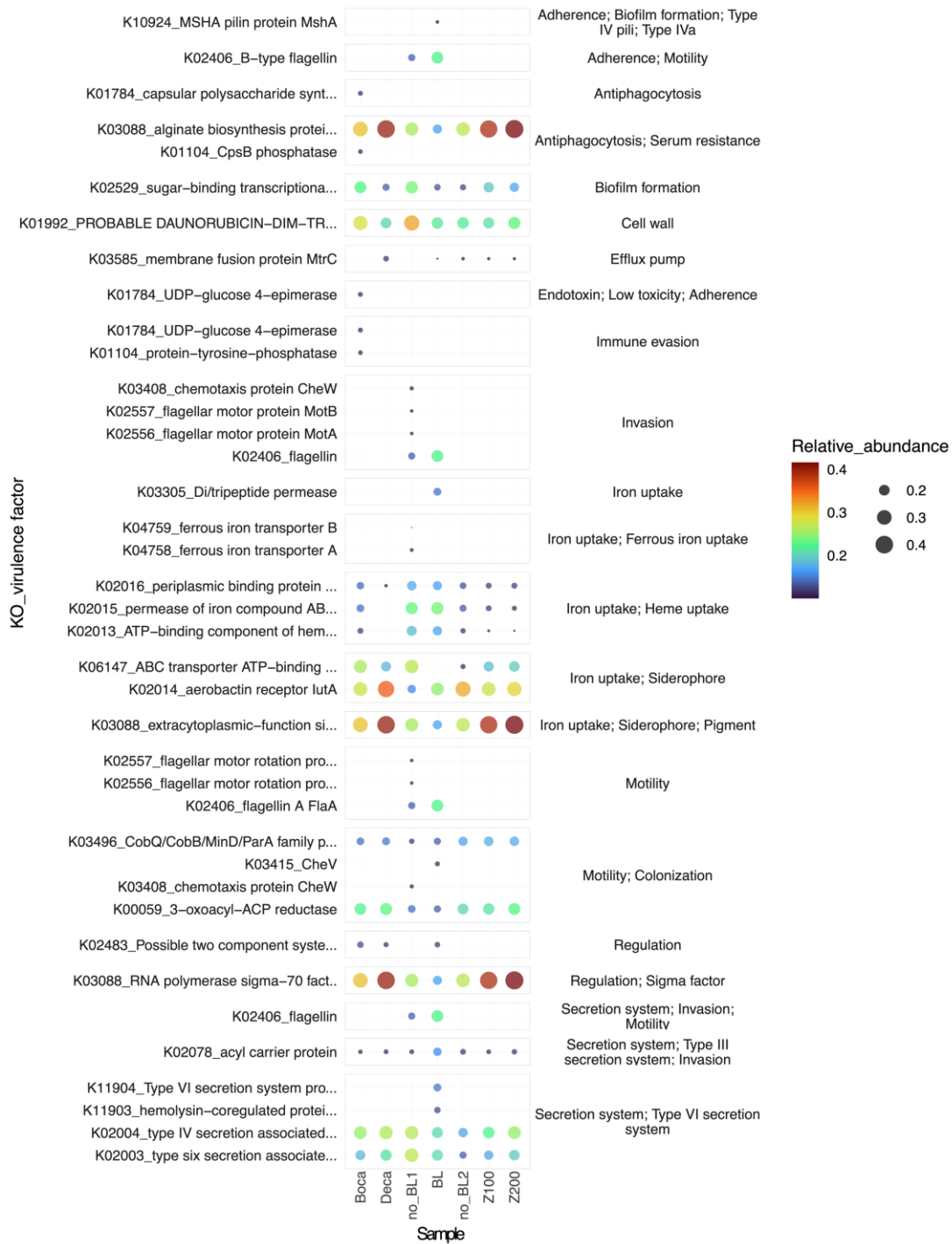


Figura A1. KOs (KEGG Orthology) de factores de virulencia que forman parte de la microbiota de RAS inferido por PICRUSt2. Factores de virulencia filtrados a partir de la base de datos generada por Pattaroni *et al.* (Pattaroni et al.). Boca : bocatoma, Deca: Decantador, BL: grupo de peces con distensión abdominal, no_BL1 y no_BL2: grupo de peces sin distensión abdominal, Z100: entrada biofiltro, Z200: salida biofiltro.

CAPITULO V: ATLANTIC SALMON (*SALMO SALAR*) TRANSFER TO SEAWATER BY GRADUAL SALINITY CHANGES EXHIBITED AN INCREASE IN THE INTESTINAL MICROBIAL ABUNDANCE AND RICHNESS

Manuscrito publicado *Microorganisms*, 2023, 11(1), 76

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11010076>

María F. Morales-Rivera^{1,2}, Diego Valenzuela-Miranda^{1,2,3}, Gustavo Nuñez-Acuña^{1,2}, Bárbara P. Benavente^{1,2}, Cristian Gallardo-Escárate^{1,2}, and Valentina Valenzuela-Muñoz^{1,2,3*}.

¹Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), University of Concepción, Concepcion 4030000, Chile; marimoralesr@udec.cl (M.F.M.-R.); divalenzuela@udec.cl (D.V.-M.); gustavonunez@udec.cl (G.N.-A.); bbenavente@udec.cl (B.P.B.)

²Laboratory of Biotechnology and Aquatic Genomics, Department of Oceanography, University of Concepción, Concepcion 4030000, Chile.; crisgallardo@oceanografia.udec.cl

³Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Chile.; valevalenzuela@udec.cl

*Correspondence: valevalenzuela@udec.cl; Tel.: +56-41-2204402

Abstract

The host's physiological history and environment determine the microbiome structure. In that sense, the strategy used for the salmon transfer to seawater after

parr-smolt transformation may influence the Atlantic salmon's intestinal microbiota. Therefore, this study aimed to explore the diversity and abundance of the Atlantic salmon intestinal microbiota and metagenome functional prediction during seawater transfer under three treatments. One group was exposed to gradual salinity change (GSC), the other to salinity shock (SS), and the third was fed with a functional diet (FD) before the seawater (SW) transfer. The microbial profile was assessed through full-16S rRNA gene sequencing using the Nanopore platform. In addition, metagenome functional prediction was performed using PICRUSt2. The results showed an influence of salinity changes on Atlantic salmon gut microbiota richness, diversity, and taxonomic composition. The findings reveal that GSC and the FD increased the Atlantic salmon smolt microbiota diversity, suggesting a positive association between the intestinal microbial community and fish health during seawater transfer. The reported knowledge can be applied to surveil the microbiome in smolt fish production, improving the performance of Atlantic salmon to seawater transfer.

Keywords: Atlantic salmon; parr-smolt transformation; seawater transfer; intestinal microbiota; Nanopore sequencing

1. Introduction

Over the past years, it has gained consensus that fish health and welfare are highly influenced by their microbiota [1]. The microbiota of marine fish can play pivotal roles in gut development, metabolism, and immune responses. Understanding how microbiomes are modified is important to understand the host-

microbe interactions and their influence on host health [2]. Therefore, different research efforts have been focused to understand the factors that shape gut microbiota in marine fish to promote healthy organisms and welfare in aquaculture production [3].

The fish microbial community has mainly been explored by molecular methods based on sequencing technologies. Herein, the sequencing of the hypervariable regions from V1 to V9 of the 16S rRNA gene was used to study the microbial diversity of marine environments [4-7]. There is no consensus on which regions should be used to assess the fish microbiota. Thus, it is possible to find studies that use different regions of the 16S rRNA gene for microbiota identification [8-10]. However, it is known that the sequencing part of hypervariable regions may affect the taxonomic diversity estimation [11-13]. In addition, it has been observed that different 16S rRNA regions for themselves are not sufficient for precise estimates of richness and higher-level taxonomic classification [14,15]. In recent years, the sequencing of the full 16S rRNA gene with the Nanopore technology (Oxford Nanopore Technologies) has been suggested as the best tool to identify microbiota for species and higher taxonomic levels [16-19].

The microbiota structure can be modulated by diverse factors, including host physiological history, diet, ecological factors, environment, among others [20-22]. Regarding environmental factors, it has been evidenced that changes in salinity can influence the structure and diversity of fish gut microbiota [23,24]. In euryhaline fish, the transfer to SW triggers fish drink rate increase [2,25]. These adaptations stabilize osmotic pressure alteration in the gut, which causes changes in the bacterial community that composes the gut microbiota [2,10,26,27].

In Chile, Atlantic salmon (*Salmo salar*) is the preferred species of salmonids on farms, accounting for 72% of production [28]. During parr-smolt transformation or smoltification, Atlantic salmon require molecular and physiological changes that allow the fish to change from FW to SW [25,29]. In natural conditions, salmonids pass through a salinity gradient from the river to the sea during smoltification [30]. However, in productive systems, smolts are often transferred from FW to SW directly, without considering the impact of a direct change in salinity in the salmon microbiota and health. It has been reported a larger diversity and richness of the skin microbiota in SW when compared with the FW phase after one and four weeks after SW migration [8]. Wang et al. [10] reported a high difference in the Atlantic salmon gut microbiota between fish in FW and fish two weeks after the SW transfer. Among their results, was observed a high abundance of the genera *Lactobacillus* and *Photobacterium* associated with FW and *Lactobacillus* and *Mycoplasma* after 22 weeks in SW. Furthermore, in recirculating aquaculture systems [31], it has been observed gut microbial richness decreases one week after SW transfer [9]. In addition, it has been reported that microbial community changes in Atlantic salmon during the SW transfer can induce fish immune system allowing infectious diseases outbreak [31]. Thus, functional diets have been developed to enhance salmonids' performance and health during smoltification [32].

Previously, we reported transcriptome variation between the Atlantic salmon intestine exposed to gradual salinity change and salinity shock [33]. The study reported a high number of transcripts differently expressed in intestines tissue of salmon exposed to the gradual salinity change compared with fish exposed to salinity shock. Furthermore, a Gen Ontology (GO) enrichment analysis showed a

high abundance of genes associated with metabolic processes, ion transmembrane transport, and immune response. Thus, it is possible to suggest changes in the Atlantic salmon intestine microbiota under different smoltification strategies. Therein, this study aimed to explore the intestine microbiota richness and abundance in Atlantic salmon smolts at genus and species level by full 16S rRNA gene Nanopore sequencing. We hypothesized that the different salinity conditions and exposition to in-feed functional ingredients could modulate the microbiome community during parr-smolt transfer. Collectively, the findings can support novel strategies for smolt production, improving animal health and welfare in salmon aquaculture.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental design

The Atlantic salmon intestine samples for this study were taken from the assays reported previously for our group [33]. Briefly, freshwater (FW) smolts (60 ± 6.2 gr) were obtained from a commercial farm (Hendrix Genetics, Chile) and transported to the Marine Biology Station, Universidad de Concepción, Dichato, Chile. Fish were maintained in ultraviolet-treated by single-pass flow-through tank systems (500 L, 30 fish/tank) on a 12:12 h light: dark cycle, the dissolved oxygen level of 8.5 mg/L and pH = 8.0, feed daily with regular diet of Cargill. After one month of acclimation, FW (control group) samples were taken. Then, the fish were separated into three experimental groups in triplicate. The first group of salmons 30 smolts per tank in triplicate, was exposed to a gradual salinity change (GSC) by increasing FW's salinity to SW. The gradient was set at three salinity points, changing 10 PSU per

week for a month. Intestine samples were taken after a week of acclimation in each salinity point. While another group of 30 smolts per tank in triplicate, was exposed to a salinity shock (SS) and was a transfer from FW to 32 PSU on the same day that the GSC group. These two groups were fed a regular diet of Cargill. The third group of 30 smolts per tank in triplicate, was fed for a month with a functional diet (FD) SuperSmolt Feed Only, Stim company (unsolicited study), and transferred to 32 PSU at the same time as the other groups. Fish intestine samples of each group were taken after a week of acclimation at 32 PSU. Furthermore, the salmon condition to SW transfer was evaluated by immune histochemistry analyses performed by the VEHICE company, Chile. In addition, RT-qPCR expression analysis of ATPase- α and ATPase- β was determined using the comparative $\Delta\Delta C_t$ relative expression analysis. The primers and qPCR conditions were similar as it was described previously for our group [33]. Animal procedures were carried out under the guidelines approved by the Ethics Committee of the University of Concepción. The experimental design considered the Three Rs (3Rs) guidelines for animal testing.

2.2. DNA extraction and full-16S rRNA amplification

After fish intestine digest was removed, intestinal tissues were thoroughly minced and then mixed with 1 mL of lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0.4% SDS, and 5 μ l of 20 mg/mL Protease K, pH 8.0), after which they were thoroughly vortexed and incubated for 2 hours at 37 °C. The samples were homogenized for 5 min at 24 Hz in an oscillating mill (MM200, Retsch) using 1.4 mm ceramic spheres, followed by the phenol:chloroform:isoamyl method. DNA integrity was assessed by 1% agarose gel electrophoresis after extraction. The DNA

concentration was measured with a Nanodrop spectrophotometer. Five individuals per experimental group were pooled in a final concentration of 100 ng/μL. The full-16S rRNA gene was amplified using the primers 27 F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and 1492 R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' [34]. Fifteen μL Taq DNA polymerase LongAmp (NewEngland Biolabs, USA) was used for amplification, under the following conditions: 95 °C for 1 min, followed by 25 cycles of 95 °C, 56 °C for 30 sec, and 65 °C for 1 min, with a final extension at 65 °C for 5 min. Electrophoresis in agarose gel at 1.2% was used to assess PCR results.

2.3. *Nanopore library synthesis and sequencing*

For Nanopore library was conducted in triplicate per each experimental group, using a full 16S rRNA PCR product of a pool of five individuals. The PCR products were purified in a ratio 1:2 sample: beads using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, USA). The samples were placed in the magnetic stand for washing with 70% ethanol (freshly prepared). The beads were resuspended with molecular biology-grade water. The purified amplicon was quantified in the Qubit 4 fluorometer (ThermoScientific, USA) and used as a template for library synthesis with the 16S Barcoding Kit (SQK-RAB204, Oxford Nanopore Technologies), following the manufacturer's instructions for 1D sequencing strategy. Briefly, a purified 16S amplicon was mixed with barcodes, and a PCR was done as described in the preceding stage, with a final reaction volume of 50 uL, using the LongAmp Taq Polymerase (New England Biolabs). The PCR product was incubated for 5 minutes at room temperature in HulaMixer (ThermoScientific, USA) and cleaned with Agencourt AMPure XP beads. The purified product was eluted in 10 uL of elution

buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0 with 50 mM NaCl). The final concentration of the library was measured using a Qubit 4 fluorometer (Thermoscientific, USA), and libraries were tested using High Sensitivity D5000 ScreenTape (Agilent, USA) according to the manufacturer's instructions on a TapeStation Bioanalyzer 2100 (Agilent, USA). Following Oxford Nanopore Technologies' methodology, the libraries were pooled in multiplex mode and sequencing into the flowcell MK1 Spot-ON FLO-MIN107-R9. As an internal control, the DNA of a microbial mock community (ZymoBiomics Microbial Community Standard) was extracted and sequenced following the same described procedures, and the observed abundances of taxa were compared with their expected abundance. Sequencing efficiency was monitored through the software MinKNOW 2.0 (Oxford Nanopore Technologies).

2.4. *Bioinformatic analysis*

The fast5 files generated were base-called using Guppy (version 3.2.2, Oxford Nanopore Technologies, UK), and a filter step was applied to retain only sequences with a Q-score ≥ 7 (quality filter). The demultiplexing, primers, and barcode trimming was done with Porechop V0.2.4 [35]. BLASTN aligned cleaned sequences 16S NCBI taxonomy database in the NanoCLUST pipeline [36]. This included filtering by sequence size 1400-1800 bp and Q-score ≥ 9 . Simpson's 1-D and Shannon index were used to estimating alpha diversity, while Pielou's index was used to estimate evenness. Microbial community structure was analyzed using Bray-Curtis dissimilarity based on taxon relative abundance data, and principal coordinate analysis (PCoA) were performed as a multivariate unsupervised data exploration. All indexes and PCoA were calculated using R's "Vegan" package [37]. Variations of

the intestinal microbiome were explored by plotting the relative abundance of phyla, orders and genera in R statistical software [38]. PICRUST2 software was used to predict metagenome function using the V3-V4 region obtained from the full16S rRNA sequences [39]. These regions were identified by an alignment between our sequencing data with universal primers [26] for V3-V4 in CLC program. The pathway levels were built using the MetaCyc database [40]. A relative abundance plot was generated using R. We used the STAMP 2.1.3 program to test for significant differences in pathway contributions [41]. A chi-square test corrected by Benjamini-Hochberg's false discovery rate was applied. For graph building, was used data with a minimum relative abundance of 0.5 to determine proportion difference.

3. Results

3.1. Experimental performance of Atlantic salmon

Chloride cell movement was seen in the immune histochemistry analysis of Atlantic salmon subjected to GSC, SS, and FD conditions, showing that the conditions were suitable for SW transfer (Figure S1). Additionally, RT-qPCR examination of ATPase- α and ATPase- β subunits validated this situation (Figure S2). In experimental groups, mortality was not observed.

3.2. Full-16S sequencing data report

The Nanopore sequencing generated 5,867,910 reads filtered by Guppy and then processed for secondary metagenomic analysis. After demultiplexing, trimming, quality, and size-filtering, 46.18% of the reads were classified by NanoCLUST. A

total of 96,160 reads were classified taxonomically, including the mock community, with a mean of 13,308 per condition. All non-classified bacteria were eliminated from the study; only classified taxa were included in the diversity and taxonomic studies (Table S1, Table S2).

3.3. Structure of the intestinal microbial community

The rarefaction curves indicated that all samples reached the plateau, which means that the number of sequences is sufficient for taxonomic classification. However, only groups 10PSU-GSC and 20PSU-GSC had more than 10000 reads (Figure S3). The Bray-Curtis dissimilarities for fish intestinal microbiota for all group show values between 0.67-0.65. The transfer from FW to SW, including the gradient, shows a high discrepancy (0.68 -0.91). The highest dissimilarity is observed at the first salinity change (10PSU-GSC: 0.91). Focusing only on the change from FW to 32PSU, we observe that 32PSU-GSC (0.67) presents the most minor dissimilarity, while 32PSU-SS and 32PSU-FD show a similar dissimilarity (0.88 – 0.85). Generally, the lowest dissimilarity was between the GSC groups (10PSU-GSC, 20PSU-GSC) and the groups 32PSU-SS and 32PSU-FD (Table S3). The principal coordinate analysis (PCoA) using the Bray-Curtis dissimilarity showed four clusters. One grouped the 10PSU-GSC and 20PSU-GSC (Fig.1A).

A second cluster grouped the 32PSU-SS and 32PSU-FD fish samples. The third cluster grouped FW samples, and the fourth cluster, the 32PSU-GSC, independently distributed. The highest bacteria diversity was observed in individuals from group 10PSU-GSC, according to the Simpson (1-D) and Shannon indexes (Figure 1B and C), while the group with the least distribution was the FW. According

to Pielou's index, the group with the least uniformity is the intestinal fish at 20PSU-GSC (Figure 1D). Related to the samples obtained after one week in SW, the Simpson's and Shannon's indexes showed high bacterial diversity in fish from 32PSU-FD (Figure 1B and C). On the other hand, Pielou's index showed more uniformity in group 32PSU-SS (Figure 1D).

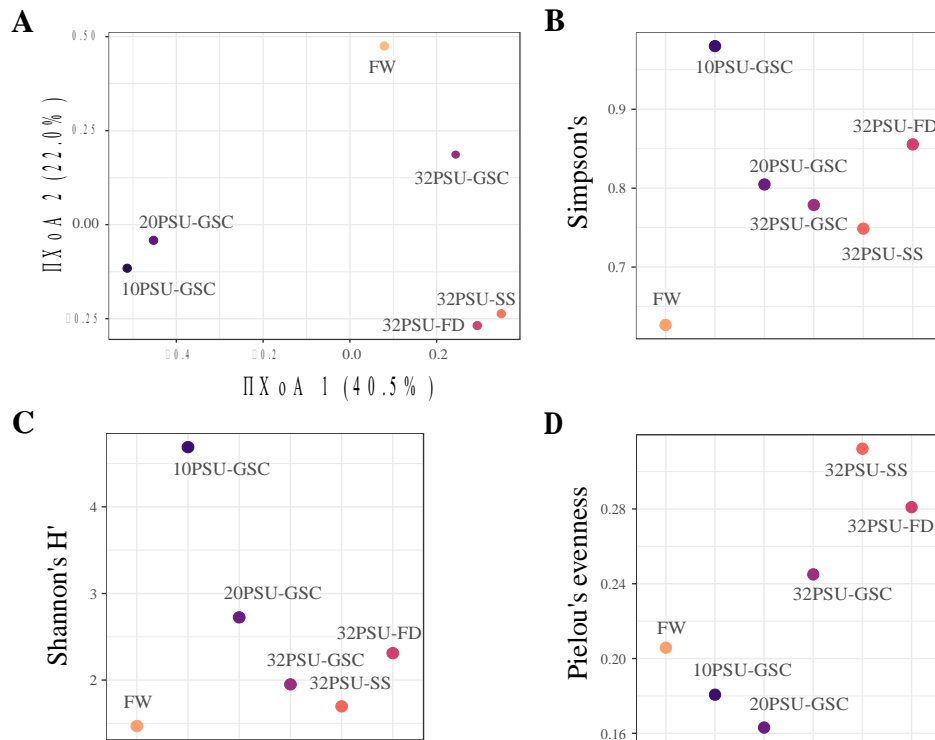


Figure 1. Diversity index of Atlantic Salmon intestinal microbiota between salinity treatments. FW: Fresh water previous treatment group, GSC : gradual salinity change at 10 PSU, 20 PSU and 32 PSU groups ; 32PSU-SS Salinity shock at 32-PSU group; 32PSU-FD: Salinity shock at 32 PSU group previously feeding with a functional diet. (A) PCoA plot of the beta diversity of microbiomes calculated by Bray-Curtis dissimilarity. (B) The Simpson's 1-D, (C) Shannon diversity index and (D) Pielou's evenness.

3.4. Atlantic salmon intestine microbiota composition during the SW transfer

All experimental groups identified ten phyla in the intestinal microbiota (Figure 2A).

89% of the microbiota was identified in *Proteobacteria* phylum. Also, the

Bacteroidetes, *Firmicutes*, and *Actinobacteria* phyla were highly abundant in the microbiota sample. Intestine samples from FW were the only ones with the presence of *Armatimonadetes*. In contrast, the intestine microbiota from 10PSU-GSC group has the presence of *Acidobacteria*, *Fusobacteria*, and *Verrucomicrobia* (Figure 2A). Whereas the phylum *Cyanobacteria* was distinguished in the intestinal microbiota of 20PSU-GSC group. Moreover, the intestine microbiota of the 32PSU-SS group only exhibited bacteria of the phylum *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*. Finally, it draws attention to the presence of *Thermotogae* phylum in the microbiota of the 32PSU-FD group (Figure 2A).

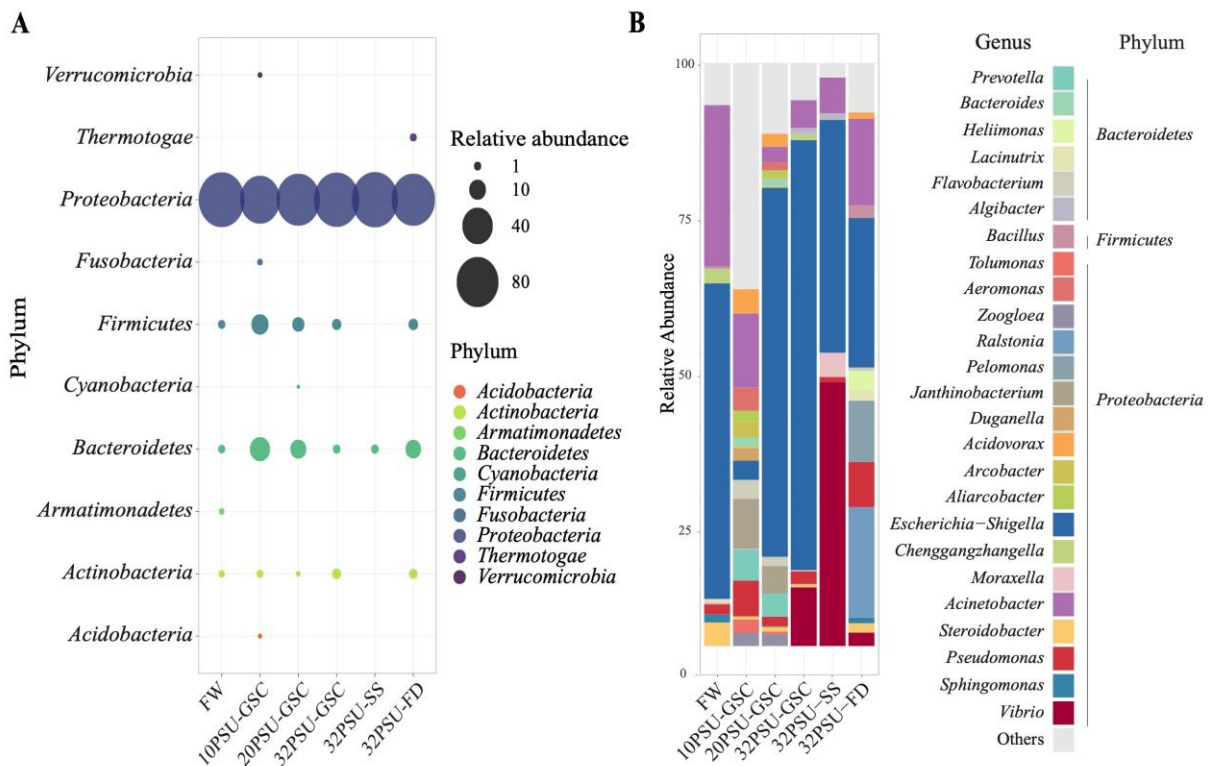


Figure 2. Relative abundance of intestinal Atlantic Salmon microbiota composition. FW: Fresh water previous treatment group, GSC: gradual salinity change at 10 PSU, 20 PSU and 32 PSU groups; 32PSU-SS Salinity shock at 32-PSU group; 32PSU-FD: Salinity shock at 32 PSU group previously feeding with a functional diet. (A) microbiota abundance at the phylum level. (B) Top 25 most abundant taxa at genus level between treatments.

The microbiota relative abundance of the top 25 genera showed a dominance of the genus *Escherichia-Shigella* (*Enterobacterales*) in all analyzed samples, except for the 10PSU-GSC group. For this group, the specie distribution was more homogenous (Figure 2B). Notably, the intestine microbiota in FW, 10PSU, and 20PSU samples exhibited more bacterial genera diversity than intestine microbiota at 32 PSU. Interestingly, the microbiota of samples of all groups at 32PSU exhibited the presence of the genus *Vibrio*, with the highest abundance in the 32PSU-SS group (Figure 2B).

Finally, a core microbiota was observed among all experimental groups. This core was composed of the orders *Flavobacteriales*, *Enterobacterales*, *Moraxellales*, and *Pseudomonadales* (Figure 3A). The analysis by genus, reveals that the genus *Escherichia-Shigella* was the most abundant in the intestine core microbiota, followed by the genus *Acinetobacter* and *Pseudomonas* (Figure 3B).

3.5. Bacteria species identified in the intestinal Atlantic salmon microbiota

Seventy clusters of species generated by NanoCLUST were above a threshold of 98.7% of identity defined by Yarza et al. [14], equivalent to only 17.7% of the total clusters. The *Acinetobacter johnsonii* is the only specie that was identified in the intestinal microbiota of all experimental groups (Table S4). In addition, it was observed species that were presented in FW and maintained in the intestine microbiota of fish exposed to the gradual salinity change, such as *Pseudomonas migulae* and *Shigella flexneri*. Furthermore, the intestine microbiota of 32PSU-GSC

was identify species such as *Aliivibrio wodanis*, *Methylobacterium brachiatum*, *Microbacterium mangrove*, *Micrococcus luteus*, and *Sphingobium yanoikuyae*.

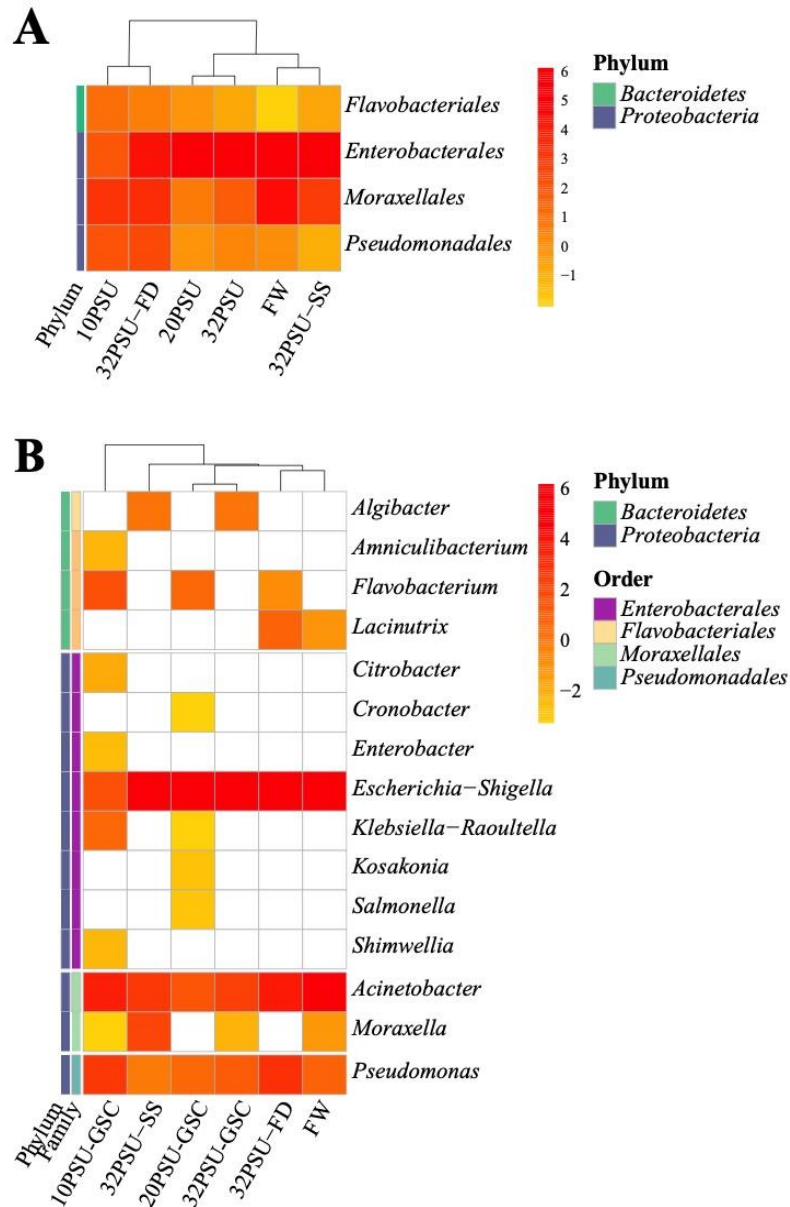


Figure 3. Heat map of normalized relative abundances of the Atlantic salmon intestine core microbiota among all experimental groups. FW: Fresh water previous treatment group, GSC : gradual salinity change at 10 PSU, 20 PSU and 32 PSU groups ; 32PSU-SS Salinity shock at 32-PSU group; 32PSU-FD: Salinity shock at 32 PSU group previously feeding with a functional diet. (A) Core microbiota at the order level (B) Core microbiota composition at the genus level.

Through the NanoCLUST analysis, 46 clusters of potentially pathogenic bacteria were classified. However, only 5 represent an average identity and relative abundance above 98.7% and 0.2, respectively (Table S4). These clusters of pathogenic groups identified in all data sets were the species *Acinetobacter johnsonii*, *Aliivibrio wodanis*, *Flavobacterium succinicans*, and *Providencia rettgeri*. Interestingly, the *Acinetobacter johnsonii* specie was presented in the intestinal microbiota of all experimental fish groups (Table S4).

3.6. Intestine microbiota after seawater transfer

In addition, the microbiota abundance and richness among fish groups after a week in seawater were evaluated. The phylum *Proteobacteria* was the most abundant in intestine microbiota for each experimental fish group. Furthermore, this phylum exhibited the highest richness at genus level. In particular, the genus *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Escherichia-Shigella*, and *Acinetobacter* were presented in microbiota at 32PSU in all groups (Figure 4). The intestinal microbiota of the 32PSU-GSC group showed more richness of phylum *Firmicutes*, especially the *Bacillales* and *Lactobacillales* genus. In addition, the 32PSU-SS group exhibited the highest abundance of *Vibrio* genus, reached 45%. The 32PSU-FD group showed more abundance and richness of genera of phylum *Bacteroidetes*. Also, this group exhibited high richness of phylum *Proteobacteria*, mainly the genus *Ralstonia* and *Pelomonas* compared with the other groups at 32PSU (Figure 4). Finally, 32PSU-FD group is the only with the presence of the genus *Thermotogae* in their microbiota.

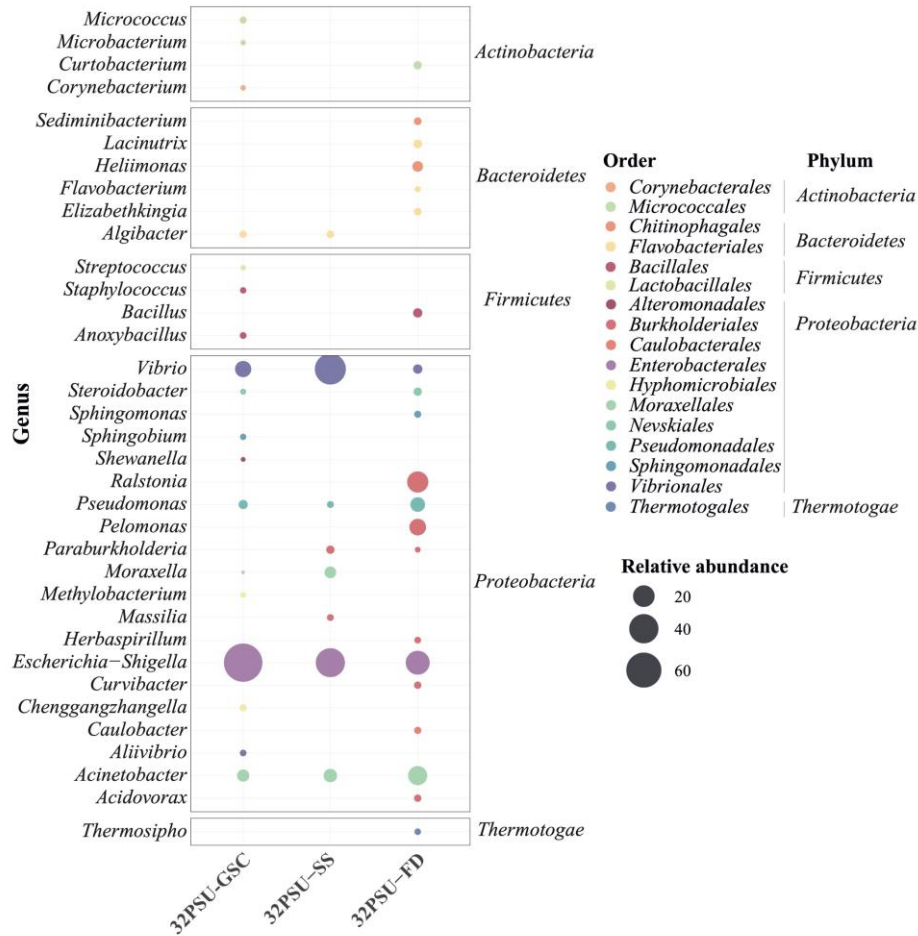


Figure 4. Relative abundance of intestinal Atlantic Salmon microbiota composition at the genus level in

3.7. Functional analysis in the intestinal Atlantic salmon microbiota

We identified 338 functional pathways in Atlantic salmon intestine microbiota with PICRUSt2 software [39]. Forty-eight of them were of level 2 the majority are related to biosynthesis (Figure 5A, Table S5). Pathways with an effect size > 0.5 and $p < 0.05$ among the salinity conditions were obtained by STAMP to compare the different SW treatments (Figure 5B, C, D). The most abundant pathways were associated with Biosynthesis of Vitamins, Amino Acids, Nucleoside and Nucleotide, Fatty acid, and Lipid (Figure 5A). The five pathways more abundant in FW group

were annotated at level 2 description Secondary Metabolite Degradation, Citrate cycle (TCA cycle), Compound Utilization and Assimilation, and Nucleoside and Nucleotide Biosynthesis. Under the top five pathways, more abundant in the 32PSU-GSC group was identified TCA cycle as level 2 description. For the group 32PSU-SS level 2 description more abundant was Secondary Metabolic Degradation and TCA cycle. While the level 2 descriptions found with more abundance in the 32PSU-FD group were Secondary Metabolite Degradation, Nucleoside and Nucleotide Biosynthesis, and TCA cycle (Table S5).

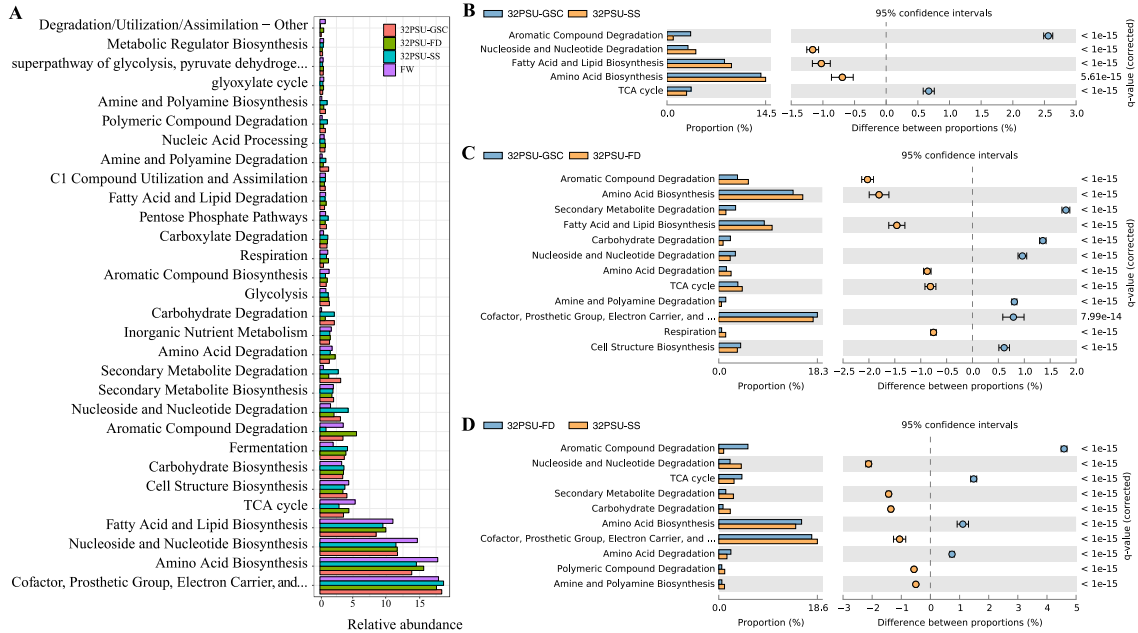


Figure 5. Relative abundance proportion of metabolic pathway (level 2). FW: Fresh water previous treatment group, GSC : gradual salinity change at 10 PSU, 20 PSU and 32 PSU groups ; 32PSU-SS Salinity shock at 32-PSU group; 32PSU-FD: Salinity shock at 32 PSU group previously feeding with a functional diet. (A) Metabolic pathways abundance in freshwater (FW) and different seawater treatment. (B-D) STAMP analysis of level 2 metabolic pathways with different abundance among samples at 32PSU. PICRUSt2 inferred metabolic pathways with a filter size of 0.5.

In addition, the comparison among FW and SW samples showed similar pathways. Notably, compared with SW the FW metagenome showed a higher abundance of TCA cycle, Fatty Acid and Lipid Biosynthesis, Nucleoside and Nucleotide Biosynthesis, and Amino Acid Biosynthesis. The functional analysis revealed a significant difference in the metagenomics potential among the samples at 32 PSU. For instance, between 32PSU-GSC and 32PSU-SS Aromatic Compound Degradation and TCA cycle were significantly higher in the 32PSU-GSC group (Figure 5B). From the comparative analysis of 32PSU-GSC and 32PSU-FD, twelve pathways showed difference abundance, highlighting the pathways such as Amino Acid Biosynthesis, Fatty Acid and Lipid Biosynthesis, and Amino Acid degradation that exhibited high abundance in the 32PSU-FD group (Figure 5C).

4. Discussion

The fish microbiota plays a relevant role in the salmon's performance and can be influenced by the diet, fish physiology, and environment among other factors. During the smoltification, Atlantic salmon are exposed to environmental change from freshwater (FW) to seawater [42]. Thus, their microbiota diversity can be modified and affect the seawater fish performance. Here, we used the full 16S rRNA sequencing to evaluate the Atlantic salmon intestinal microbiota variation during the SW transfer under different strategies. It was explored if a fish transfer to SW by gradual salinity change (GSC) exhibited differences in microbiota abundance and diversity compared with fish exposed to salinity shock (SS), as it is performed in the industry.

A total of 19 OTUs have been reported in the core microbiota between FW and SW intestine Atlantic salmon [20]. Among these OTUs the authors reported the presence of *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia/Shigella*, *Pseudomonas*, and *Mycoplasma*. Also, Dehler et al. [26] reported *Escherichia/Shigella* in the core microbiota of Atlantic salmon pre-smolts in FW in aquarium and loch environment conditions. In addition, Lorgen-Ritchie et al. [9] also describe the presence of *Pseudomonas sp.* in the core microbiota of FW/SW Atlantic salmon gut. Interestingly, in this study identified a microbial core composed of *Pseudomonas*, *Escherichia/Shigella*, and *Acinetobacter*. The presence of *Acinetobacter* bacteria in Atlantic salmon gut microbiota has not been described previously. However, in FW Atlantic salmon skin microbiota has been reported to have a high abundance of *Acinetobacter* [8]. It is suggested that the low diversity in the intestine core microbiota found is due to the study being carried out under laboratory conditions that can reduce the environmental microbiota.

Previously, has been reported high species richness of Atlantic salmon gut micro-biota in sea cages compared with the FW gut microbiota [10]. Also, increased bacteria diversity has been reported in FW gut microbiota of Atlantic salmon in a RAS system compared with salmon gut microbiota transfer to SW [9]. In this study, the bacteria diversity analysis showed that the salmon intestinal microbiota of the 10PSU-GSC group exhibited the highest bacteria diversity among the intestine samples evaluated. Thus, this suggests that the gradual adaptation of salmon from FW to 10PSU-GSC favors the intestinal microbiota diversity in pre-smolts. Interestingly, among the intestine samples evaluated after a week in seawater, the Atlantic salmon microbiota exposed to GCS and the group feeding with the FD

exhibited the highest bacteria diversity than the group transferred to SW by salinity shock. Notably, the transcriptome analysis of Atlantic salmon transfer to SW by gradual salinity change reported an expression increase of immune-related genes compared with salmon exposed to salinity shock [33]. Thus, it is possible to suggest that the increase of microbiota diversity in fish exposed to GSC can be associated with healthy fish. In general, a low diversity in the intestinal microbiota is a marker of dysbiosis and has been associated with a wide range of diseases in humans [43]. Now, in fish, tilapia diseased-looking fish (ocular exophthalmos, skin hemorrhages, skin lesions, and necrosis) have been found to have a lower diversity index than healthy fish [44].

Among the phylum presented in Atlantic salmon intestine microbiota, previous studies have reported a freshwater predominance of the phyla *Proteobacteria* and *Firmicutes* [9,10,21]. Also, high dominance of the *Proteobacteria* phylum has been reported in seawater [9]. Moreover, a high presence of *Firmicutes* has been observed in the Atlantic salmon intestine after 20 weeks in SW [10]. Also, the phylum *Proteobacteria* has demonstrated an abundance decrease after 8 months in seawater [10]. In this study, the phylum *Proteobacteria* was the most abundant in all evaluated intestine samples. Among treatments, *Firmicutes* and *Bacteroidetes* phyla were more abundant in the intestine of fish exposed to 10 and 20 PSU. Moreover, the *Firmicutes* phylum has been described in the gut core microbiota of Atlantic salmon identified between FW and SW [26]. Here, the GSC group's intestine microbiota exhibited *Firmicutes* from FW to all salinity's points. Also, the intestine microbiota of the FD group presented the *Firmicutes* phylum. Thus, suggest that the FD and the GSC stimulate *Firmicutes* to establish. Also, the use of functional

ingredients in salmon farming, such as insect meal, galactomannan oligosaccharides, and prebiotics, increase the *Firmicutes* abundance [3,10]. Notably, the *Firmicutes* phylum is not presented in the intestine microbiota of fish exposed to saline shock. Similarly, in wild salmon, the *Firmicutes* phylum is observed in stages associated with the FW, such as parr, smolts, and returning adults [45]. The gradual salinity change, and the functional diet allow the presence of the *Firmicutes* phylum.

Vibrio genus was identified in the Atlantic salmon intestine microbiota after a week at 32 PSU, mainly in fish exposed to the salinity shock. Species of this genus are abundant in marine ecosystems [43,44]. For instance, *Vibrio* species have been reported in the intestines of shrimp, mollusks, abalones, and others [44]. Furthermore, the genus *Vibrio* is associated with pathogenicity in fish [45]. Also, in Atlantic salmon smolts after four weeks of SW transfer has been reported the presence of *Vibrionaceae* family in gut microbiota [9]. Moreover, the comparative study of the gut microbiota of Atlantic salmon in the control aquarium vs. loch environment has reported the presence of *Aliivibrio* in the core microbiota [20].

Notably, the genus *Lactobacillus* has been reported in greater abundance in Atlantic salmon intestine microbiota [9,10,26]. Moreover, has been reported the presence of *Lactobacillus* in the intestinal core microbiota of Atlantic salmon in FW and SW [26]. In addition, in a RAS system, the *Lactobacillus* sp. was identified among Atlantic salmon's FW gut core microbiota [9]. In this study, the intestinal microbiota analyzed exhibited the absence of the genus *Lactobacillus*. However, the *Streptococcus thermophilus*, from the *Lactobacillales* order, was identified in the intestine microbiota of 32PSU-GSC. We hypothesize that the absence of *Lactobacillus* genus in our study can be a consequence of DNA extraction method

used [46]. Another explanation can be associated with the Taq Polymerase used for the 16S library preparation, which may not be favoring the detection of this genus [47].

An advantage of using the complete 16S rRNA sequencing by Nanopore sequencing is the possibility to infer microbiota metagenome. In this study, we used the V3-V4 region from 16S to perform functional analysis. However, the intestinal Atlantic salmon microbiota in this study showed some differences compared with other studies. For instance, in FW microbiota of salmon has been reported a high proportion of function associated with Carbohydrate Metabolisms, TCA cycle, Lipid Biosynthesis, Fatty Acid Biosynthesis, and oxidative phosphorylation [26]. While, in SW fish microbiota exhibited a high enrichment of pathways such as Carbohydrate Metabolism, Amino Sugar and Nucleotide Sugar Metabolism, and Glycolysis/Gluconeogenesis. Also, differences in the metabolic processes of Atlantic salmon gut microbiota in FW and SW were reported by Lorgen-Ritchie et al. [9]. In this study, the intestine microbiota from SW groups exhibited a high relative abundance of pathways associated with Carbohydrate Degradation, Cell Structure, Secondary Metabolite Degradation. Notably, in our study, the metagenomic analysis FW and SW microbiota exhibited a high abundance of TCA cycle, Fatty Acid and Lipid Biosynthesis, Nucleoside and Nucleotide Biosynthesis, and Amino Acid Biosynthesis. In general, Amino Acid Biosynthesis stands out in metagenomic functional studies on intestinal fish [51]. Furthermore, valine, leucine, and isoleucine are essential metabolites for fish [52]. The 32 PSU-FD fish intestinal microbiota exhibited the highest enrichment of Amino Acid Biosynthesis. Contrary to our supposition, 32PSU-SS fish microbiota ranks second. However, focusing on the

essential amino acid degradation pathway is more favored in the FD and SS treatments over GSC. Aromatic Compound Degradation is the pathway with the most significant differences between treatments. Aromatic amino acids, plant constituents, drugs, additives, colorants, and contaminants are some of the sources of aromatic compounds in the intestine [53]. Therefore, FD and GSC may have an advantage over SS in using aromatic compounds as a carbon source and eliminating toxins from the bacteria found in the fish intestine.

Concerning the findings archived during the study for the in-feed functional ingredients, there is strong evidence of the association of functional ingredients such as essential fatty acids, nucleotides, yeast cell walls, and prebiotics in the modulation of the intestinal fish microbiota [10,48]. For instance, a high abundance of *Proteobacteria*, and *Mycoplasmas* has been observed in Atlantic salmon feeding with functional ingredients after 44 weeks in seawater, compared with salmon feeding with a regular diet [10]. For instance, a high abundance of *Proteobacteria*, and *Mycoplasmas* have been observed in Atlantic salmon feeding with functional ingredients after 44 weeks in seawater, compared with salmon feeding with a regular diet. Also, a high difference in the microbiota diversity in sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) feeding with functional ingredients (FI) has been reported [48]. Furthermore, sea bass feeding with FI reduction of fish potentially pathogenic bacteria such as *Vibrionales* [48]. Notably, the results obtained in the current study revealed that fish feeding with FD exhibited a higher richness of bacteria genus than the other experimental groups. Furthermore, Atlantic salmon feeding with FD at 32 PSU showed a low abundance of *Vibrio* genus compared with the other experimental

groups. Thus, besides functional ingredients improving the fish immune system, it also has a consequence on the fish microbiota abundance and richness.

Our results show the potentiality of salmon microbiota studies to determine the smolts condition. It was demonstrated that the gradual salinity change increases the salmon microbiota abundance, thus increasing their health. The implementation of an Atlantic salmon transfer by a gradual exposition to the seawater could increase the transfer's success. Nowadays, the salmon industry has been increasing the time of fish in the RAS conditions before transferring to seawater as a strategy to reduce the exposition to sea pathogens [55]. Thus, the industry could implement the gradual salinity change in RAS systems, improving the salmon performance in seawater.

5. Conclusions

The differences in the diversity indices demonstrate variation in the intestinal microbiota of Atlantic salmon during the transfer from FW to SW. The richness and diversity indices were more significant in the intestinal microbiota of Atlantic salmon exposed to a gradual salinity change. *Proteobacteria* were dominant in all groups, but there were variations in lower taxonomic levels in all conditions. *Escherichia/Shigella* were found in high abundance as part of SW microbiota. Despite the taxonomic differences found among treatments, a low percentage of the metabolic pathways analyzed showed significant differences; most of them are related to biosynthesis. Finally, this is the first study that evaluates the intestinal microbiota of Atlantic salmon exposed to gradual salinity change during the

smoltification, and it shows that this way of transferring to SW increases the diversity of the microbiota of the fish and thus improves their health condition.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms11010076/s1>; Figure S1: Experimental design; Figure S2: Localization of chloride cells in the gill filament epithelium; Figure S3: RT-qPCR analysis of ATPase- α and ATPase- β subunits; Figure S4: Rarefaction curve; Figure S5: Mock community composition; Table S1: Sequencing data report; Table S2: Complete NanoCLUST classification cluster; Table S3: Bray-Curtis similarities for intestine samples calculated on R with Vegan Package; Table S4: NanoCLUST average percent identity of Clusters at the species level. Species with percentage of identity ≥ 98.7 based on the full sequence of 16S rRNA gene and relative abundance $\geq 0.2\%$; Table S5: Complete metabolic MetaCyc pathway abundance of freshwater (FW) and different seawater treatment inferred by PICRUSt2.

Author Contributions: Conceptualization, María F. Morales-Rivera, Diego Valenzuela-Miranda, Gustavo Nuñez-Acuña and Valentina Valenzuela-Muñoz; Data curation, María F. Morales-Rivera; Formal analysis, María F. Morales-Rivera; Funding acquisition, Diego Valenzuela-Miranda, Cristian Gallardo-Escárte and Valentina Valenzuela-Muñoz; Investigation, María F. Morales-Rivera, Bárbara P. Benavente and Valentina Valenzuela-Muñoz; Methodology, María F. Morales-Rivera, Diego Valenzuela-Miranda, Gustavo Nuñez-Acuña, Bárbara P. Benavente, Cristian Gallardo-Escárte and Valentina Valenzuela-Muñoz; Project administration,

Valentina Valenzuela-Muñoz; Resources, Cristian Gallardo-Escárate; Supervision, Cristian Gallardo-Escárate and Valentina Valenzuela-Muñoz; Visualization, María F. Morales-Rivera; Writing – original draft, María F. Morales-Rivera and Valentina Valenzuela-Muñoz; Writing – review & editing, Diego Valenzuela-Miranda, Gustavo Nuñez-Acuña, Cristian Gallardo-Escárate and Valentina Valenzuela-Muñoz.

All authors will be informed about each step of manuscript processing including submission, revision, revision reminder, etc. via emails from our system or assigned Assistant Editor.

Funding: This research was funded by ANID-Chile through the Postdoctoral grant FONDECYT (3190320), grants FONDAP (15110027), FONDECYT (1210852), FONDECYT (11220307), Postdoctoral grant FONDECYT (3200600).

Data Availability Statement: Not applicable

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

References

1. Egerton, S.; Culloty, S.; Whooley, J.; Stanton, C.; Ross, R.P. The Gut Microbiota of Marine Fish. *Front Microbiol* 2018, 9, 873, doi:10.3389/fmicb.2018.00873.
2. Schmidt, V.T.; Smith, K.F.; Melvin, D.W.; Amaral-Zettler, L.A. Community assembly of a euryhaline fish microbiome during salinity acclimation. *Molecular Ecology* 2015, 24, 2537-2550, doi:10.1111/mec.13177.
3. Li, Y.; Bruni, L.; Jaramillo-Torres, A.; Gajardo, K.; Kortner, T.M.; Krogdahl, A. Differential response of digesta- and mucosa-associated intestinal microbiota to dietary insect meal during the seawater phase of Atlantic salmon. *Anim Microbiome* 2021, 3, 8, doi:10.1186/s42523-020-00071-3.

4. Harrison, B.K.; Myrbo, A.; Flood, B.E.; Bailey, J.V. Abrupt burial imparts persistent changes to the bacterial diversity of turbidite-associated sediment profiles. *Geobiology* 2018, 16, 190-202, doi:10.1111/gbi.12271.
5. Labonte, J.M.; Lever, M.A.; Edwards, K.J.; Orcutt, B.N. Influence of Igneous Basement on Deep Sediment Microbial Diversity on the Eastern Juan de Fuca Ridge Flank. *Front Microbiol* 2017, 8, 1434, doi:10.3389/fmicb.2017.01434.
6. Mills, H.J.; Reese, B.K.; Shepard, A.K.; Riedinger, N.; Dowd, S.E.; Morono, Y.; Inagaki, F. Characterization of Metabolically Active Bacterial Populations in Subseafloor Nankai Trough Sediments above, within, and below the Sulfate-Methane Transition Zone. *Front Microbiol* 2012, 3, 113, doi:10.3389/fmicb.2012.00113.
7. Rud, I.; Kolarevic, J.; Holan, A.B.; Berget, I.; Calabrese, S.; Terjesen, B.F. Deep-sequencing of the bacterial microbiota in commercial-scale recirculating and semi-closed aquaculture systems for Atlantic salmon post-smolt production. *Aquacultural Engineering* 2017, 78, 50-62, doi:10.1016/j.aquaeng.2016.10.003.
8. Lokesh, J.; Kiron, V. Transition from freshwater to seawater reshapes the skin-associated microbiota of Atlantic salmon. *Scientific Reports* 2016, 6, 19707, doi:10.1038/srep19707.
9. Lorgen-Ritchie, M.; Clarkson, M.; Chalmers, L.; Taylor, J.F.; Migaud, H.; Martin, S.A.M. A Temporally Dynamic Gut Microbiome in Atlantic Salmon During Freshwater Recirculating Aquaculture System (RAS) Production and Post-seawater Transfer. *Frontiers in Marine Science* 2021, 8, 711797, doi:10.3389/fmars.2021.711797.
10. Wang, J.; Jaramillo-Torres, A.; Li, Y.; Kortner, T.M.; Gajardo, K.; Brevik, O.J.; Jakobsen, J.V.; Krogdahl, A. Microbiota in intestinal digesta of Atlantic salmon (*Salmo salar*), observed from late freshwater stage until one year in seawater, and effects of functional ingredients: a case study from a commercial sized research site in the Arctic region. *Animal Microbiome* 2021, 3, 14, doi:10.1186/s42523-021-00075-7.
11. Bukin, Y.S.; Galachyants, Y.P.; Morozov, I.V.; Bukin, S.V.; Zakharenko, A.S.; Zemskaya, T.I. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Sci Data* 2019, 6, 190007, doi:10.1038/sdata.2019.7.
12. Kerrigan, Z.; Kirkpatrick, J.B.; D'Hondt, S. Influence of 16S rRNA Hypervariable Region on Estimates of Bacterial Diversity and Community Composition in Seawater and Marine Sediment. *Front Microbiol* 2019, 10, 1640, doi:10.3389/fmicb.2019.01640.
13. Willis, C.; Desai, D.; LaRoche, J. Influence of 16S rRNA variable region on perceived diversity of marine microbial communities of the Northern North Atlantic. *FEMS Microbiol Lett* 2019, 366, doi:10.1093/femsle/fnz152.
14. Yarza, P.; Yilmaz, P.; Pruesse, E.; Glockner, F.O.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H.; Whitman, W.B.; Euzéby, J.; Amann, R.; Rossello-Mora, R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* 2014, 12, 635-645, doi:10.1038/nrmicro3330.

15. Matsuo, Y.; Komiya, S.; Yasumizu, Y.; Yasuoka, Y.; Mizushima, K.; Takagi, T.; Kryukov, K.; Fukuda, A.; Morimoto, Y.; Naito, Y., et al. Full-length 16S rRNA gene amplicon analysis of human gut microbiota using MinION nanopore sequencing confers species-level resolution. *BMC Microbiol* 2021, 21, 35, doi:10.1186/s12866-021-02094-5.
16. Fujiyoshi, S.; Muto-Fujita, A.; Maruyama, F. Evaluation of PCR conditions for characterizing bacterial communities with full-length 16S rRNA genes using a portable nanopore sequencer. *Scientific Reports* 2020, 10, 12580, doi:10.1038/s41598-020-69450-9.
17. Johnson, J.S.; Spakowicz, D.J.; Hong, B.Y.; Petersen, L.M.; Demkowicz, P.; Chen, L.; Leopold, S.R.; Hanson, B.M.; Agresta, H.O.; Gerstein, M., et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications* 2019, 10, 5029, doi:10.1038/s41467-019-13036-1.
18. Shin, J.; Lee, S.; Go, M.J.; Lee, S.Y.; Kim, S.C.; Lee, C.H.; Cho, B.K. Analysis of the mouse gut microbiome using full-length 16S rRNA amplicon sequencing. *Scientific Reports* 2016, 6, 29681, doi:10.1038/srep29681.
19. Cusco, A.; Catozzi, C.; Vines, J.; Sanchez, A.; Francino, O. Microbiota profiling with long amplicons using Nanopore sequencing: full-length 16S rRNA gene and the 16S-ITS-23S of the *rrn* operon. *F1000Res* 2018, 7, 1755, doi:10.12688/f1000research.16817.2.
20. Dehler, C.E.; Secombes, C.J.; Martin, S.A. Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 2017, 467, 149-157, doi:10.1016/j.aquaculture.2016.07.017.
21. Skrodenyte-Arbaciauskiene, V.; Virbickas, T.; Luksa, J.; Serviene, E.; Blazyte-Cereskiene, L.; Kesminas, V. Gut Microbiome of Wild Baltic Salmon (*Salmo salar* L.) Parr. *Microbial Ecology* 2021, 10.1007/s00248-021-01910-9, doi:10.1007/s00248-021-01910-9.
22. Sprockett, D.; Fukami, T.; Relman, D.A. Role of priority effects in the early-life assembly of the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018, 15(4), 197-205, doi:10.1038/nrgastro.2017.173.
23. Dulski, T.; Kujawa, R.; Godzieba, M.; Ciesielski, S. Effect of Salinity on the Gut Microbiome of Pike Fry (*Esox lucius*). *Applied Sciences* 2020, 10 (7), 2506, doi:10.3390/app10072506.
24. Wu, P.; Liu, Y.; Li, C.; Xiao, Y.; Wang, T.; Lin, L.; Xie, Y. The Composition of Intestinal Microbiota From *Collichthys lucidus* and Its Interaction With Microbiota From Waters Along the Pearl River Estuary in China. *Frontiers in Environmental Science* 2021, 9, 675856, doi:10.3389/fenvs.2021.675856.
25. Sundh, H.; Nilsen, T.O.; Lindstrom, J.; Hasselberg-Frank, L.; Stefansson, S.O.; McCormick, S.D.; Sundell, K. Development of intestinal ion-transporting mechanisms during smoltification and seawater acclimation in Atlantic salmon *Salmo salar*. *J Fish Biol* 2014, 85, 1227-1252, doi:10.1111/jfb.12531.

26. Dehler, C.E.; Secombes, C.J.; Martin, S.A.M. Seawater transfer alters the intestinal microbiota profiles of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Scientific Reports* 2017, 7, 13877, doi:10.1038/s41598-017-13249-8.
27. Milligan-Myhre, K.; Small, C.M.; Mittge, E.K.; Agarwal, M.; Currey, M.; Cresko, W.A.; Guillemin, K. Innate immune responses to gut microbiota differ between oceanic and freshwater threespine stickleback populations. *Dis Model Mech* 2016, 9, 187-198, doi:10.1242/dmm.021881.
28. Sernapesca. Informe sanitario con informacion sanitaria de agua dulce y mar año 2021. Departamento de Salud Animal. Subdirección de Acuicultura. Gobierno de Chile 2021.
29. Nisembaum, L.G.; Martin, P.; Lecomte, F.; Falcon, J. Melatonin and osmoregulation in fish: A focus on Atlantic salmon *Salmo salar* smoltification. *J Neuroendocrinol* 2021, 33, e12955, doi:10.1111/jne.12955.
30. Folmar, L.C.; Dickhoff, W.W. The parr-smolt transformation (smoltification) and seawater adaptation in salmonids. A review of selected literature. *Aquaculture* 1980, 21, 1-37, doi:10.1016/0044-8486(80)90123-4.
31. Johansson, L.H.; Timmerhaus, G.; Afanasyev, S.; Jorgensen, S.M.; Krasnov, A. Smoltification and seawater transfer of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is associated with systemic repression of the immune transcriptome. *Fish Shellfish Immunol* 2016, 58, 33-41, doi:10.1016/j.fsi.2016.09.026.
32. Sahlmann, C.; Djordjevic, B.; Lagos, L.; Mydland, L.T.; Morales-Lange, B.; Øvrum Hansen, J.; Ånestad, R.; Mercado, L.; Bjelanovic, M.; Press, C.M., et al. Yeast as a protein source during smoltification of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), enhances performance and modulates health. *Aquaculture* 2019, 513, 734396, doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734396.
33. Valenzuela-Muñoz, V.; Gallardo-Escarate, C.; Benavente, B.P.; Valenzuela-Miranda, D.; Nunez-Acuna, G.; Escobar-Sepulveda, H.; Valdes, J.A. Whole-Genome Transcript Expression Profiling Reveals Novel Insights into Transposon Genes and Non-Coding RNAs during Atlantic Salmon Seawater Adaptation. *Biology (Basel)* 2021, 11, doi:10.3390/biology11010001.
34. Lane, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, Stackebrandt, E., Goodfellow, M., Eds. Wiley: 1991; Vol. 4, pp. 115-175.
35. Wick, R. Porechop: an adapter trimmer for Oxford Nanopore reads. <https://github.com/rrwick/Porechop>. 2018.
36. Rodriguez-Perez, H.; Ciuffreda, L.; Flores, C. NanoCLUST: a species-level analysis of 16S rRNA nanopore sequencing data. *Bioinformatics* 2021, 37, 1600-1601, doi:10.1093/bioinformatics/btaa900.
37. Dixon, P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science* 2003, 14, 927-930, doi:10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x.

38. R-Core-Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020.
39. Douglas, G.M.; Maffei, V.J.; Zaneveld, J.R.; Yurgel, S.N.; Brown, J.R.; Taylor, C.M.; Huttenhower, C.; Langille, M.G.I. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology* 2020, 38, 685-688, doi:10.1038/s41587-020-0548-6.
40. Caspi, R.; Billington, R.; Fulcher, C.A.; Keseler, I.M.; Kothari, A.; Krummenacker, M.; Latendresse, M.; Midford, P.E.; Ong, Q.; Ong, W.K., et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Research* 2018, 46, D633-D639, doi:10.1093/nar/gkx935.
41. Parks, D.H.; Tyson, G.W.; Hugenholtz, P.; Beiko, R.G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* 2014, 30, 3123-3124, doi:10.1093/bioinformatics/btu494.
42. Thompson, F.L.; Gevers, D.; Thompson, C.C.; Dawyndt, P.; Naser, S.; Hoste, B.; Munn, C.B.; Swings, J. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71, 5107-5115, doi:10.1128/AEM.71.9.5107-5115.2005.
43. Valdes, A.M.; Walter, J.; Segal, E.; Spector, T.D. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* 2018, 361, k2179, doi:10.1136/bmj.k2179.
44. Ofek, T.; Lallar, M.; Izhaki, I.; Halpern, M. Intestine and spleen microbiota composition in healthy and diseased tilapia. *Anim Microbiome* 2022, 4, 50, doi:10.1186/s42523-022-00201-z.
45. Llewellyn, M.S.; McGinnity, P.; Dionne, M.; Letourneau, J.; Thonier, F.; Carvalho, G.R.; Creer, S.; Derome, N. The biogeography of the atlantic salmon (*Salmo salar*) gut microbiome. *Isme j* 2016, 10, 1280-1284, doi:10.1038/ismej.2015.189.
46. Eilers, H.; Pernthaler, J.; Amann, R. Succession of Pelagic Marine Bacteria during Enrichment: a Close Look at Cultivation-Induced Shifts. *Applied and Environmental Microbiology* 2000, 66, 4634-4640, doi:10.1128/aem.66.11.4634-4640.2000.
47. Thompson, F.L.; Iida, T.; Swings, J. Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2004, 68, 403 - 431, doi:10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004.
48. Austin, B.; Austin, D.A. In *Bacterial Fish Pathogens, Disease of Farmed and Wild Fish*, Springer, Ed. Springer, Cham.: 2016; 10.1007/978-3-319-32674-0.
49. Mann, B.C.; Bezuidenhout, J.J.; Swanevelder, Z.H.; Grobler, A.F. MinION 16S datasets of a commercially available microbial community enables the evaluation of DNA extractions and data analyses. *Data Brief* 2021, 36, 107036, doi:10.1016/j.dib.2021.107036.
50. Rozas, M.; Brillet, F.; Callewaert, C.; Paetzold, B. MinION Nanopore Sequencing of Skin Microbiome 16S and 16S-23S rRNA Gene Amplicons. *Front Cell Infect Microbiol* 2021, 11, 806476, doi:10.3389/fcimb.2021.806476.

51. Huang, Q.; Sham, R.C.; Deng, Y.; Mao, Y.; Wang, C.; Zhang, T.; Leung, K.M.Y. Diversity of gut microbiomes in marine fishes is shaped by host-related factors. *Mol Ecol* 2020, 29, 5019-5034, doi:10.1111/mec.15699.
52. Roques, S.; Deborde, C.; Richard, N.; Skiba-Cassy, S.; Moing, A.; Fauconneau, B. Metabolomics and fish nutrition: a review in the context of sustainable feed development. *Reviews in Aquaculture* 2018, 12, 261-282, doi:10.1111/raq.12316.
53. Díaz, E.; Ferrández, A.; Prieto, M.A.; García, J.L. Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001, 65, 523-569, table of contents, doi:10.1128/mnbr.65.4.523-569.2001.
54. Rimoldi, S.; Torrecillas, S.; Montero, D.; Gini, E.; Makol, A.; Valdenegro, V.V.; Izquierdo, M.; Terova, G. Assessment of dietary supplementation with galactomannan oligosaccharides and phytochemicals on gut microbiota of European sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) fed low fishmeal and fish oil based diet. *PLoS One* 2020, 15, e0231494, doi:10.1371/journal.pone.0231494.
55. Dalsgaard, J.; Lund, I.; Thorarinsdottir, R.; Drengstig, A.; Arvonen, K.; Pedersen, P.B. Farming different species in RAS in Nordic countries: Current status and future perspectives. *Aquacultural Engineering* 2013, 53, 2-13, doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.11.008.

Supplementary materials

Figures

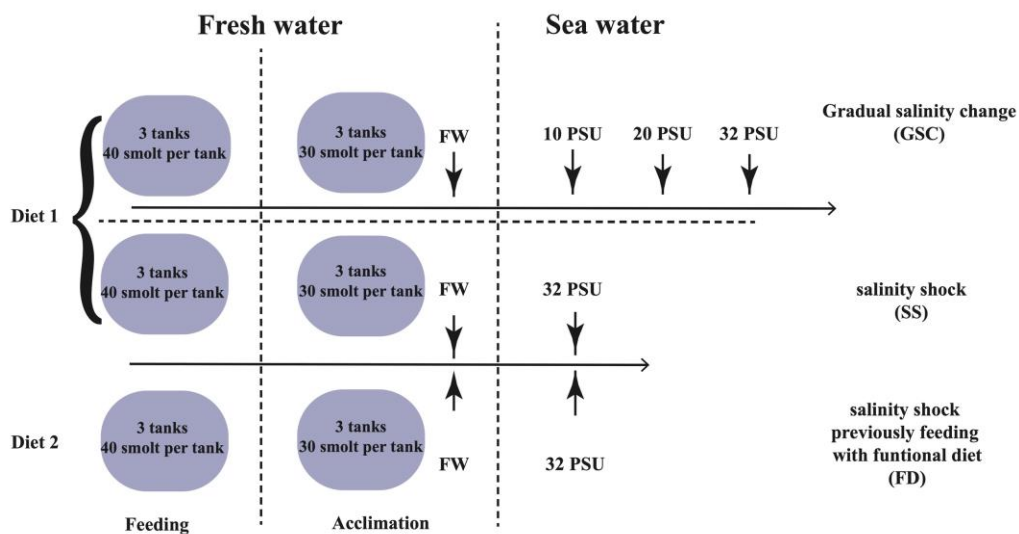


Figure S1. Experimental design. Freshwater (FW), gradual salinity change (GSC), salinity shock (SS), and salinity shock before feeding with a functional diet (FP) treatment for Atlantic salmon smolts (n=30 fish/tank). Diet 1: Cargill. Diet 2: SuperSmolt Feed Only. Sample points are indicated with a black arrow.

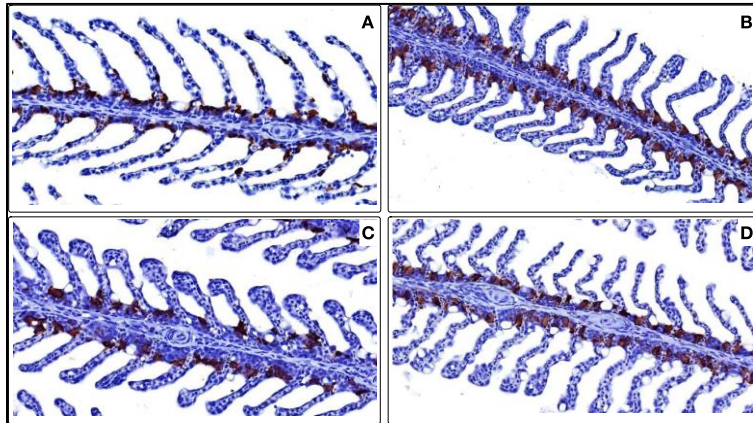


Figure S2. Localization of chloride cells in the gill filament epithelium. A) FW gills sample; B) GSC 32 PSU; C) SS 32 PSU; D) FD 32 PSU. A) Na⁺/K⁺-ATPase positive cells located in the middle region of the superficial interlamellar space and near the lamellar vascular axis. B-C Na⁺/K⁺-ATPase positive cell deeper in the epithelium.

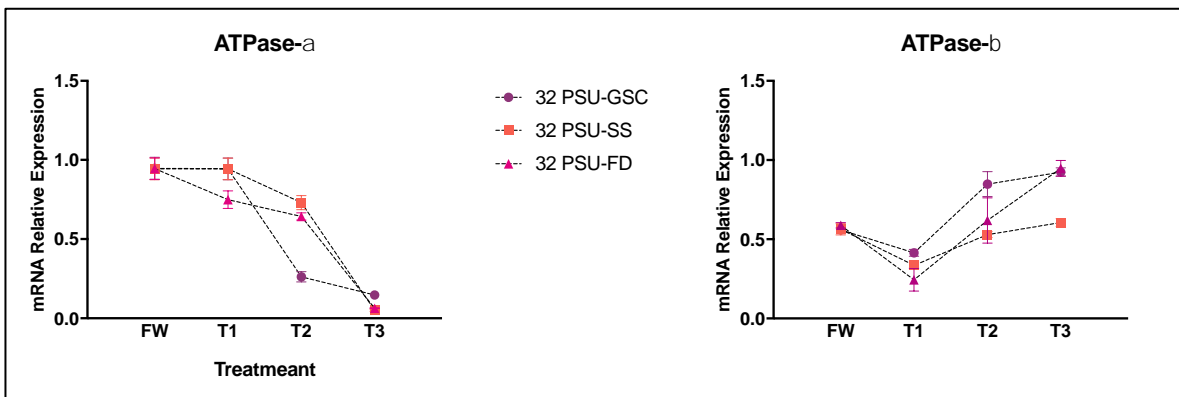


Figure S3. RT-qPCR analysis of ATPase- α and ATPase- β subunits.

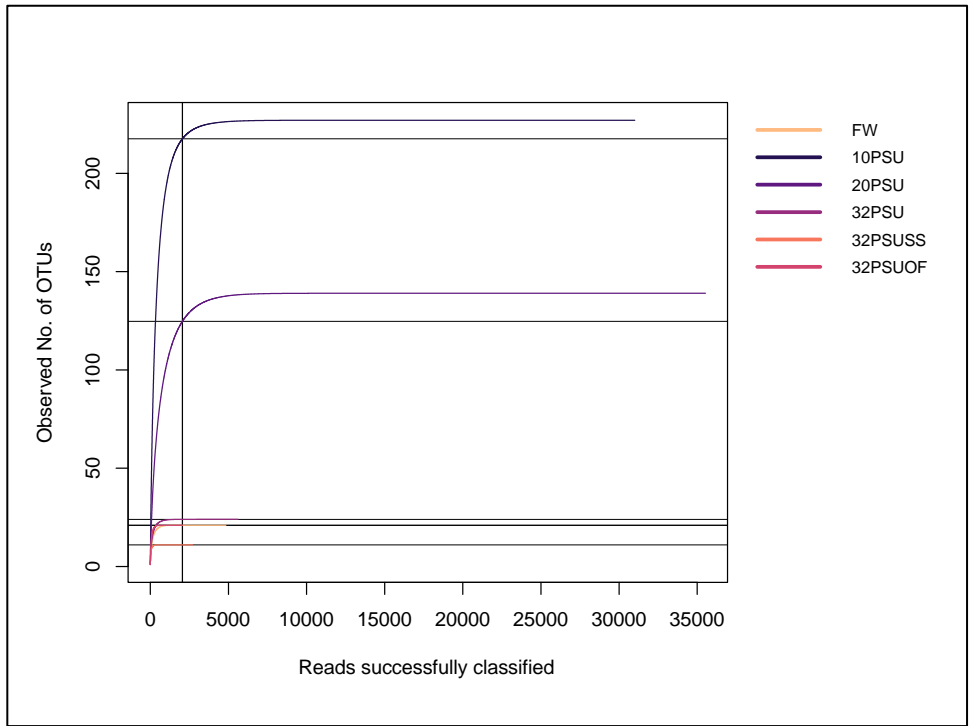


Figure S4. Rarefaction curve.

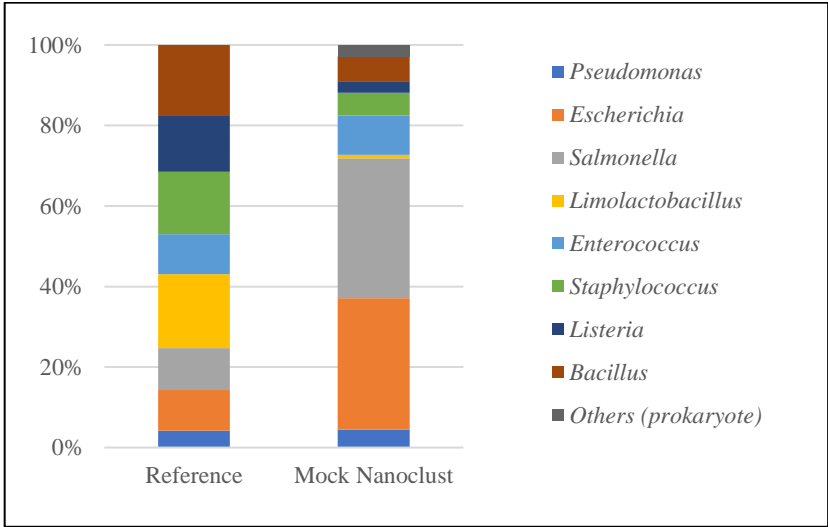


Figure S5. Mock community composition.

Tables

Table S1: Sequencing data report

PycoQC sequencing report					
Run	Reads	Pass reads	Bases	N50 length	Med Read Quality
Run1	1.057.010	572.635	233.406.176	477	8,15
Run2	3.687.103	2.513.372	1.100.488.945	434	8,76
Run3	4.077.332	2.781.903	1.220.612.486	444	8,99
Total	8.821.445	5.867.910	2.554.507.607		
Classification report by treatment					
	Pass Porechop	Pass NanoCLUST	Pass NanoCLUST classification		
Mock	723.496	13.162	11.527		
FW	406.455	5.139	4.920		
10 PSU-GSC	198.492	38.488	30.835		
20 PSU-GSC	150.384	49.368	35.524		
32 PSU-GSC	393.174	8.163	5.594		
32 PSU-FD	553.295	2.180	2.051		
32 PSUSS	285.080	3.047	2.709		
Total	2.710.376	119.547	93.160		

Table S2: Complete NanoCLUST classification cluster.

Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7470760>

Table S3: Bray-Curtis similarities for intestine samples calculated on R with Vegan Package.

	FW	10PSU-GSC	20PSU-GSC	32PSU-GSC	32PSU-SS
10PSU-GSC	0.9122202				
20PSU-GSC	0.8767837	0.6564537			
32PSU-GSC	0.6864566	0.9405967	0.8746218		
32PSU-SS	0.8784126	0.9771927	0.9612655	0.6726891	
32PSU-FD	0.8491341	0.9768470	0.9432824	0.7866374	0.7323160

Table S4. NanoCLUST average percent identity of Clusters at the species level. Species with percentage of identity ≥ 98.7 based on the full sequence of 16S rRNA gene and relative abundance $\geq 0.2\%$.

Species identifies by NanoCLUST	Average identity (%) \pm SD					
	FW	10PSU- GSC	20PSU- GSC	32PSU- GSC	32PSU- SS	32PSU-FD
<i>Acidovorax radicans</i>			99.2 \pm 0.00			
<i>Acinetobacter johnsonii</i> *	95.2 \pm 3.67	95.3 \pm 3.85	91.5 \pm 0.00	93.4 \pm 2.29	99.3 \pm 0.00	99.2 \pm 0.00
<i>Akkermansia muciniphila</i>		99.2 \pm 0.00				
<i>Aliivibrio wodanis</i> *				99.0 \pm 0.00		
<i>Alistipes onderdonkii</i>		91.6 \pm 3.15	99.0 \pm 0.00			
<i>Alistipes putredinis</i>		94.1 \pm 7.42	99.8 \pm 0.00			
<i>Anaerosinus glycerini</i>			99.4 \pm 0.00			
<i>Arcobacter venerupis</i>		99.6 \pm 0.00				
<i>Bacillus cereus</i>	99.1 \pm 0.00					99.8 \pm 0.00
<i>Bacteroides caccae</i>		99.4 \pm 0.00				
<i>Bradyrhizobium mercantei</i>	99.0 \pm 0.00					
<i>Bradyrhizobium rifense</i>		99.4 \pm 0.00				
<i>Cloacibacterium caeni</i>		99.5 \pm 0.00				
<i>Cloacibacterium normanense</i>			99.4 \pm 0.00			
<i>Cutibacterium acnes</i>		99.7 \pm 0.00	99.9 \pm 0.00			
<i>Elizabethkingia anophelis</i>						99.0 \pm 0.00
<i>Eubacterium rectale</i>		99.5 \pm 0.00				
<i>Flavobacterium cheniae</i>		99.3 \pm 0.00				
<i>Flavobacterium succinicans</i> *		98.1 \pm 7.25	98.8 \pm 4.22			
<i>Heliomonas saccharivorans</i>						98.9 \pm 0.00
<i>Herbaspirillum huttiense</i>						99.0 \pm 0.00
<i>Lactococcus raffinolactis</i>		93.0 \pm 0.49	99.5 \pm 0.00			
<i>Megasphaera massiliensis</i>		99.1 \pm 0.00				
<i>Methylobacterium brachiatum</i>				99.1 \pm 0.00		
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	97.5 \pm 0.00					
<i>Microbacterium ginsengisoli</i>	99.6 \pm 0.00	99.8 \pm 0.00				
<i>Microbacterium mangrovi</i>				94.6 \pm 0.00		
<i>Micrococcus luteus</i>				99.7 \pm 0.00		
<i>Moraxella osloensis</i>	98.6 \pm 0.00	98.6 \pm 0.00		99.3 \pm 0.00	99.0 \pm 0.00	
<i>Morganella morganii</i>		97.6 \pm 1.60	98.7 \pm 0.00			
<i>Paraburkholderia fungorum</i>					98.5 \pm 0.00	99.2 \pm 0.00
<i>Pelomonas saccharophila</i>						99.1 \pm 0.00
<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>		99.0 \pm 0.00				

<i>Phocaeicola coprocola</i>		99.2±0.00			
<i>Providencia rettgeri</i> *		98.9±0.00			
<i>Pseudomonas brenneri</i>		99.4±0.00			
<i>Pseudomonas cedrina</i>					99.4±0.00
<i>Pseudomonas migulae</i>	98.5±0.00	99.1±0.00	95.5±0.00	99.3±0.00	
<i>Rahnella aquatilis</i>		99.2±0.00			
<i>Ralstonia insidiosa</i>					99.4±0.00
<i>Rhizobium zeae</i>	99.6±0.00	99.4±0.00			
<i>Shigella flexneri</i>	97.3±2.47	99.5±0.00	97.0±3.38	95.9±0.34	
<i>Shigella sonnei</i>			93.5±0.00	98.9±0.00	
<i>Sphingobium yanoikuyae</i>				99.5±0.00	
<i>Staphylococcus aureus</i>			99.6±0.00	96.9±0.00	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	99.8±0.00		99.5±0.00	98.9±0.00	
<i>Thermosipho melanesiensis</i>					100.0±0.00
<i>Uruburuella suis</i>		99.6±0.00			

Table S5: Complete metabolic MetaCyc pathway relative abundance of freshwater (FW) and different seawater treatment inferred by PICRUSt2.

Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7470760>

Anexo Capítulo V

Tabla A1. Evaluación de Crecimiento de peces sometidos a diferentes tratamientos de salinidad durante el proceso de transferencia de agua dulce a agua de mar. Medidas de talla, peso condición de Fulton (K-factor) de los peces bajo los diferentes tratamientos de salinidad .

	Salinidad	Fecha	Grupo	ID	peso (gr)	largo	horquilla	K (índice condición)
	Ctrl (FW)	08.07	FW	1	25	14,5	13,5	1,016
	Ctrl (FW)	08.07	FW	2	34	15	14	1,239
	Ctrl (FW)	08.07	FW	3	39	16	15	1,156
	Ctrl (FW)	08.07	FW	4	35	15	15	1,037
	Ctrl (FW)	08.07	FW	5	39	16,5	14,5	1,279
Promedios ± SD					34,40 ± 5,73	15,40 ± 0,82	14,40 ± 0,65	1,145 ± 0,12
	10 PSU	22.07	GSC	1	49	17	16,5	1,091
	10 PSU	22.07	GSC	2	58	18	16,5	1,291
	10 PSU	22.07	GSC	3	47	17	16	1,147
	10 PSU	22.07	GSC	4	47	16	15	1,393
	10 PSU	22.07	GSC	5	44	16	15	1,304
Promedios ± SD					49,00 ± 5,34	16,80 ± 0,84	15,80 ± 0,76	1,245 ± 0,12
	32 PSU	22.07	SS	6	50	16,5	15,5	1,343
	32 PSU	22.07	SS	7	52	16	15	1,541
	32 PSU	22.07	SS	8	47	16,5	15,5	1,262
	32 PSU	22.07	SS	9	45	16	15	1,333
	32 PSU	22.07	SS	10	45	16	15	1,333
Promedios ± SD					47,80 ± 3,11	16,20 ± 0,27	15,20 ± 0,27	1,362 ± 0,10
	32 PSU	22.07	FD	11	47	16	15,5	1,262
	32 PSU	22.07	FD	12	42	16	15	1,244
	32 PSU	22.07	FD	13	46	16	15	1,363
	32 PSU	22.07	FD	14	54	16	15	1,600
	32 PSU	22.07	FD	15	44	16	15	1,304
Promedios ± SD					46,60 ± 4,56	16,00 ± 0,00	15,10 ± 0,22	1,355 ± 0,14
	20 PSU	05.08	GSC	16	69	18,3	17,6	1,266
	20 PSU	05.08	GSC	17	48	16,2	15,1	1,394
	20 PSU	05.08	GSC	18	62	17,2	16,6	1,355
	20 PSU	05.08	GSC	19	64	18,2	17,3	1,236
	20 PSU	05.08	GSC	20	50	16,8	16	1,221
Promedios ± SD					58,60 ± 9,15	17,34 ± 0,90	16,52 ± 1,01	1,294 ± 0,08
	32 PSU	05.08	SS	21	67	18,5	17,6	1,229
	32 PSU	05.08	SS	22	66	18,3	17,4	1,253
	32 PSU	05.08	SS	23	57	17,3	16,4	1,292
	32 PSU	05.08	SS	24	53	16,5	15,8	1,344
	32 PSU	05.08	SS	25	58	17,3	16,6	1,268
Promedios ± SD					60,20 ± 6,06	17,58 ± 0,82	16,76 ± 0,74	1,277 ± 0,04
	32 PSU	05.08	FD	26	65	17,8	17	1,323
	32 PSU	05.08	FD	27	60	17,8	16,9	1,243
	32 PSU	05.08	FD	28	58	17,3	16,5	1,291
	32 PSU	05.08	FD	29	60	17,8	16,6	1,312
	32 PSU	05.08	FD	30	61	17,6	16,9	1,264
Promedios ± SD					60,80 ± 2,59	17,66 ± 0,22	16,78 ± 0,22	1,287 ± 0,03
	32 PSU	25.08	GSC	31	70	19	18	1,200
	32 PSU	25.08	GSC	32	66	18	17	1,343
	32 PSU	25.08	GSC	33	71	19	18	1,217
	32 PSU	25.08	GSC	34	78	20	19	1,137
	32 PSU	25.08	GSC	35	82	19	18	1,406
Promedios ± SD					73,40 ± 6,47	19,00 ± 0,71	18,00 ± 0,71	1,261 ± 0,11
	32 PSU	25.08	SS	36	71	18	17	1,445
	32 PSU	25.08	SS	37	87	19	18	1,492
	32 PSU	25.08	SS	38	86	20	19	1,254
	32 PSU	25.08	SS	39	81	19	18	1,389
	32 PSU	25.08	SS	40	89	20	19	1,298
Promedios ± SD					82,80 ± 7,22	19,20 ± 0,84	18,20 ± 0,84	1,375 ± 0,10
	32 PSU	25.08	FD	41	78	19	18	1,337
	32 PSU	25.08	FD	42	52	16,5	15,5	1,396
	32 PSU	25.08	FD	43	71	19	18	1,217
	32 PSU	25.08	FD	44	69	18	17	1,404
	32 PSU	25.08	FD	45	118	22,5	21,5	1,187
Promedios ± SD					77,60 ± 24,52	19,00 ± 2,21	18,00 ± 2,21	1,309 ± 0,10

FW: Agua dulce previo a los tratamientos de salinidad GSC: cambio gradual de la salinidad a 10 PSU, 20 PSU y 32 PSU; 32PSU-SS shock salino a 32-PSU group; 32PSU-FD: shock salino 32 PSU en el grupo de peces previamente alimentados con una dieta funcional.

Tabla A2. Análisis de ANOVA de 2 vías con prueba de Tukey para evaluar el crecimiento de peces sometidos a diferentes tratamientos de salinidad durante el proceso de transferencia de agua dulce a agua de mar.

K- factor: 2way ANOVA: multiple comparisons	
Number of families	3
Number of compariso	3
Alpha	0,05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
T1					
GSC vs. SS	-0,1172	-0.2702 to 0.03581	No	ns	0,1614
GSC vs. FD	-0,1094	-0.2624 to 0.04361	No	ns	0,2018
SS vs. FD	0,0078	-0.1452 to 0.1608	No	ns	0,9915
T2					
GSC vs. SS	0,0172	-0.1358 to 0.1702	No	ns	0,9593
GSC vs. FD	0,0078	-0.1452 to 0.1608	No	ns	0,9915
SS vs. FD	-0,0094	-0.1624 to 0.1436	No	ns	0,9877
T3					
GSC vs. SS	-0,115	-0.268 to 0.03801	No	ns	0,1721
GSC vs. FD	-0,0476	-0.2006 to 0.1054	No	ns	0,7294
SS vs. FD	0,0674	-0.08561 to 0.2204	No	ns	0,5345
GSC					
T1 vs. T2	-0,0492	-0.1927 to 0.09425	No	ns	0,6572
T1 vs. T3	-0,0154	-0.1589 to 0.1281	No	ns	0,9587
T2 vs. T3	0,0338	-0.1097 to 0.1773	No	ns	0,8179
SS					
T1 vs. T2	0,0852	-0.05825 to 0.2287	No	ns	0,3027
T1 vs. T3	-0,0132	-0.1567 to 0.1303	No	ns	0,9695
T2 vs. T3	-0,0984	-0.2419 to 0.04505	No	ns	0,2111
FD					
T1 vs. T2	0,068	-0.07545 to 0.2115	No	ns	0,4572
T1 vs. T3	0,0464	-0.09705 to 0.1899	No	ns	0,6876
T2 vs. T3	-0,0216	-0.1651 to 0.1219	No	ns	0,9206

Weight: 2way ANOVA: multiple comparisons	
Number of families	3
Number of compariso	3
Alpha	0,05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
T1					
GSC vs. SS	1,2	-14.1 to 16.5	No	ns	0,98
GSC vs. FD	2,4	-12.9 to 17.7	No	ns	0,9223
SS vs. FD	1,2	-14.1 to 16.5	No	ns	0,98
T2					
GSC vs. SS	-1,6	-16.9 to 13.7	No	ns	0,9647
GSC vs. FD	-2,2	-17.5 to 13.1	No	ns	0,9343
SS vs. FD	-0,6	-15.9 to 14.7	No	ns	0,9949
T3					
GSC vs. SS	-9,4	-24.7 to 5.899	No	ns	0,3021
GSC vs. FD	-4,2	-19.5 to 11.1	No	ns	0,7817
SS vs. FD	5,2	-10.1 to 20.5	No	ns	0,6866
GSC					
T1 vs. T2	-9,6	-22.89 to 3.695	No	ns	0,1816
T1 vs. T3	-24,4	-37.69 to -11.11	Yes	***	0,0006
T2 vs. T3	-14,8	-28.09 to -1.505	Yes	*	0,0282
SS					
T1 vs. T2	-12,4	-25.69 to 0.8948	No	ns	0,0695
T1 vs. T3	-35	-48.29 to -21.71	Yes	****	<0.0001
T2 vs. T3	-22,6	-35.89 to -9.305	Yes	**	0,0013
FD					
T1 vs. T2	-14,2	-27.49 to -0.9052	Yes	*	0,0355
T1 vs. T3	-31	-44.29 to -17.71	Yes	****	<0.0001
T2 vs. T3	-16,8	-30.09 to -3.505	Yes	*	0,0129

GSC: cambio gradual de la salinidad a 10 PSU (T1), 20 PSU (T2) y 32 PSU (T3); 32PSU-SS shock salino a 32-PSU group; 32PSU-FD: shock salino 32 PSU en el grupo de peces previamente alimentados con una dieta funcional.

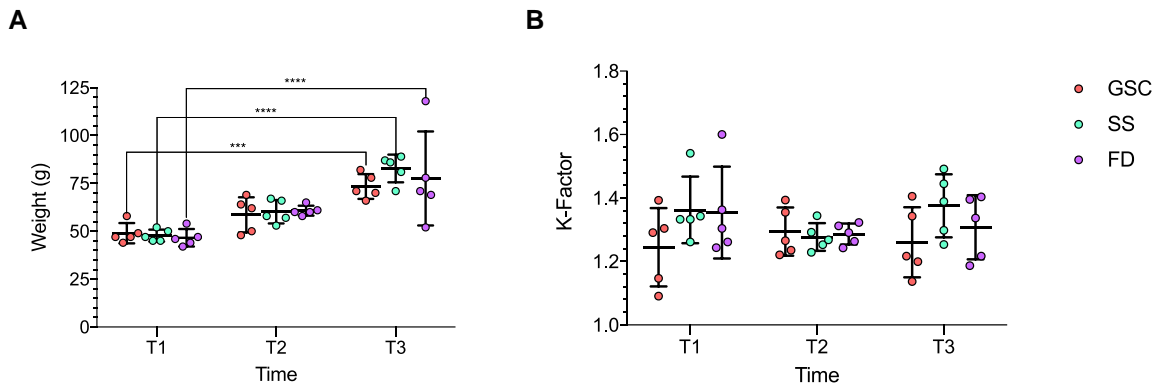


Figura A1. Evaluación de Crecimiento de peces sometidos a diferentes tratamientos de salinidad durante el proceso de transferencia de agua dulce a agua de mar. **A.** Medidas de peso (***) $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$) **B.** Condición de Fulton (K-factor).

CAPÍTULO VI: NANOPORE SEQUENCING EVIDENCED THE PRESENCE OF FISH BACTERIAL PATHOGENS IN THE SEA LOUSE (*CALIGUS ROGERCRESSEYI*) MICROBIOTA COLLECTED FROM DISTANT SALMON FARMS IN CHILE

Manuscrito Publicado. *Aquaculture* 552 (2022) 738026

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738026>

María F. Morales-Rivera^{1,2}, Diego Valenzuela-Miranda^{1,2*}, Valentina Valenzuela-Muñoz^{1,2}, Gustavo Nuñez-Acuña^{1,2}, Ruben Avendaño-Herrera^{1,3}, and Cristian Gallardo-Escárate^{1,2}

¹Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), University of Concepción, P. O. Box 160-C, Concepción, Chile

²Laboratory of Biotechnology and Aquatic Genomics, Department of Oceanography, University of Concepción, Concepción, Chile.

³Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuícola, Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andrés Bello, Viña del Mar, Chile.

*Corresponding author: divalenzuela@udec.cl

Abstract

The recognized negative impacts of the ectoparasite *Caligus rogercresseyi* in the Chilean salmon aquaculture are primarily related to environmental and economic issues. However, recent evidence suggests a large and diverse microbial community associated with sea lice, where fish bacteria pathogens emerge as a sanitary

concern. This study aimed to characterize the bacterial community associated with *C. rogercresseyi*, focusing on those microorganisms with potential impacts in salmon welfare. The sea lice-associated microbiota was identified using the microbial full-length 16S rRNA gene sequencing by Oxford Nanopore Technology. Sea lice specimens were collected from three salmon farming zones in Los Lagos, Aysén, and Magallanes, Southern Chile. The bioinformatic analyses revealed DNA from potential pathogens inhabiting the *C. rogercresseyi* microbiota, representing 7.86% of the annotated sequences. Among the sampled sites, the most significant number of pathogenic bacteria DNA was found in Los Lagos (up to 23.6%), followed by Aysén (1.8%) and Magallanes (0.3%). Herein, genetic evidence from a total of 30 potential fish bacterial pathogens species were identified. Notably, fourteen *Vibrio* spp. were predominantly found in the Los Lagos region, while six *Tenacibaculum* spp. were more equally distributed among the sites. A core of five fish pathogens was observed in all farming zones, including *Aliivibrio wodanis*, *T. dicentrarchi*, *T. ovolyticum*, *T. soleae*, and *V. splendidus*. Based on the reported findings, sea lice emerge as a potential reservoir for fish diseases in the aquatic environment.

Keywords: Sea lice; Microbiota; pathogen; Nanopore; 16S rRNA gene; *Tenacibaculum*; *Moritella*.

Introduction

The sea louse *Caligus rogercresseyi* is a marine ectoparasite that has become one of the major concerns for salmon aquaculture in Chile (Gallardo-Escárate et al., 2019). This parasite feeds on mucus and skin on its hosts, producing skin damage

that can lead to chronic stress, reducing feed conversion rates and growth in farmed salmon (Gonzalez et al., 2003; Gonzalez et al., 2015; Johnson et al., 2004). Pharmacological treatments are routinely administered during salmon production to cope with sea lice infestation. It has been estimated that delousing treatments increase production costs on average by \$1.4 US/kg (Dresdner et al., 2019). Beyond the economic impact, delousing treatments usually implies salmon crowding, which constitutes a secondary source of physiological stress and fish mortality (Overton et al., 2019; Walde et al., 2021). As stress negatively impacts the immune system in fish (Urbinati et al., 2020), parasitism together with the delousing treatments can induce an immunosuppressed status on the host, leaving them prone to secondary bacterial infections (Fast, 2014; Gonzalez et al., 2003; Valenzuela-Munoz et al., 2016). Recently, it has been evidence that sea lice mean abundance is scientifically associated with the cumulative mortalities caused by the bacteria *Piscirickettsia salmonis* in farmed salmonids in Chile (Arriagada et al., 2019a). In this scenario, opportunistic bacterial pathogens associated with sea lice may become a new focus of concern for the industry.

Marine ectoparasites can fulfill roles in the transmission of pathogens among fish. Previously, it has been suggested that parasites like *Zeuxapta seriolae* and *Caligus lalandei* could transmit bacterial pathogens such as *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* in the yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) (Sepulveda et al., 2017). In the Northern hemisphere, the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* has shown that under experimental conditions, the parasite can act as a vector for the transmission of *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* in Atlantic salmon (Novak et al., 2016). Regarding *C. rogercresseyi*, although a potential role has been

proposed as a vector for transmitting the Infectious salmon anemia virus (ISAv)(Oelckers et al., 2014), less is known about bacterial agents. A recent study has reported the microbial community associated with sea lice, revealing a complex microbial composition related to salmon farms (Goncalves et al., 2020). The findings showed the potential use of high-throughput DNA sequencing to characterize the microbiota in parasites from distant geographical zones. However, the pathogenic bacteria community in *C. rogercresseyi* associated with fish farming has not been explicitly explored.

Different methods can be used to identify bacterial composition from complex samples. Culture-based techniques have routinely been used to recover, identify and characterize bacterial fish pathogens. However, this methodology is technically laborious, and the existence of non-cultivable bacteria hinders microbial characterization. In this context, the 16S ribosomal gene has extensively been used to identify bacterial species (Ranjan et al., 2016). The 16S rRNA gene is ubiquitously and highly conserved among prokaryotes species, but at the same time, presents nine hypervariable regions (V1-V9) that can be used to identify bacterial species (Clarridge, 2004). Thus, sequencing a single hypervariable region have been used to study the microbial diversity in marine environments (Bienhold et al., 2016; Harrison et al., 2018; Labonte et al., 2017; Mills et al., 2012). However, sequencing different hypervariable regions can impact on the estimated taxonomical diversity (Kerrigan et al., 2019). Moreover, it has been evidenced that assessing the 16S rRNA gene by a short-read sequencing approach cannot reach the same level of taxonomical resolution as the one obtained by sequencing the entire gene (~1,400 bp) (Johnson et al., 2019). In this scenario, applying long-read sequencing in

metagenomic studies has recently been used as a promising approach for understanding microbial communities (Ciuffreda et al., 2021; Goncalves et al., 2020; Matsuo et al., 2021; Nygaard et al., 2020; Valenzuela-Miranda et al., 2022). Therefore, this study aimed to apply long-read sequencing to identify fish bacterial pathogens in sea lice with potential impact on salmon aquaculture. Notably, microbial-specific signatures were found in *C. rogercresseyi* associated with Atlantic salmon farming, where the main productive zones evidenced more diversity of pathogenic bacteria. Based on the reported findings, sea lice emerge as a reservoir for fish diseases in the salmon industry. However, the role of the sea lice as a transmission vector and the potential co-infections events is unclear. Future studies will be conducted to identify virulence factors in the sea lice-associated microbiota and putative antibiotic resistance genes at the molecular level.

Materials and methods

Site selection and sample collection

Adult sea lice were collected from commercial salmon farms from Los Lagos to Magallanes (Southern Chile). Sampling sites were selected to avoid farms with less than eight months of seawater production and prioritizing farms with fewer antimicrobial or delousing treatments. Thus, seven sites were available for sampling, including Los Lagos (4), Aysen (2), and Magallanes (1) regions. In each farm, Atlantic salmon (*Salmo salar*) specimens were anesthetized with Benzocaine (20%) in seawater, in order to collect at least 30 adult sea lice per site. Parasites were collected with sterile plastic forceps and fixed in molecular grade absolute ethanol.

Sea lice samples were maintained at -20°C and transported to the Laboratory of Biotechnology and Aquatic Genomics (Concepción, Chile) and stored at -80°C until further processing.

DNA isolation and full-length 16S rRNA gene amplification

DNA was isolated according to previously standardized protocols (Goncalves et al., 2020). Briefly, samples were thawed at room temperature, and ten adult sea lice (5 males and 5 females) were pooled for each farm. Parasites were minced and mixed in vortex with lysis buffer (10mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 100mM EDTA, 0.4% SDS, and 24 µg/mL Protease K, pH 8.0) and incubated overnight at 56 °C. After incubation, the pools were centrifuged at room temperature for 1 min at 5,000 rpm, and the supernatant mixed molecular grade absolute ethanol and filtered through a silica column by centrifugation at room temperature for 1 min at 8,500 rpm. After two washing steps, the DNA was eluted in 30 µL of DEPC water, and the DNA integrity was evaluated through an agarose gel. Then, according to the manufacturer's instructions, the DNA concentration was estimated by fluorescence in a Qubit 4 (Thermo Scientific, USA) with the dsDNA BR Assay Kit (Thermo Scientific, USA). For the full-length 16S rRNA gene amplification, isolated DNA from all seven sampled points was used for PCR using the universal specific primers for the amplification of the full-length 16S rRNA gene 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', with Taq DNA polymerase LongAmp (NewEngland Biolabs, USA). The PCR program included a denaturation step at 95 °C for 1 min, followed by 25 cycles of 95 °C for 20 sec, 56 °C for 30 sec and 65 °C for 2 min, and an extension at 65 °C for 5

min. 16S rRNA PCR amplicons were finally confirmed through an agarose gel.

Nanopore 16S rRNA library preparation and sequencing

16S rRNA gene amplicons were purified using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, USA) according to the manufacturer's instructions. Purified PCR products were quantified by Qubit 4 (Thermo Scientific, USA) and used for nanopore library preparation using the 16S Barcoding Kit (SQK-RAB204, Oxford Nanopore Technologies) according to manufacturer's instructions. Thus, 16S rRNA amplicons were barcoded through PCR as previously described using the LongAmp Taq Polymerase (New England Biolabs) and purified as previously described. PCR products were incubated at room temperature for 5 min in the HulaMixer (ThermoFisher, USA), and after a magnetic bead washing step, amplicons were eluted in buffer (10mM Tris-HCl pH 8.0 with 50mM NaCl). The quality of the obtained libraries was confirmed through TapeStation Bioanalyzer 2100 (Agilent, USA), using DNA ScreenTape (Agilent, USA), and quantity was estimated by fluorescence with a Qubit 4. According to the manufacturer's instructions, the seven libraries were evenly pooled and sequenced in a Nanopore MinION platform (Oxford Nanopore Technologies, UK) using the MK1 Spot-ON FLO-MIN107-R9 flowcell. As an internal normalizer, a library prepared from DNA isolated from a mock community (ZymoBiomics Microbial Community Standard) was also included as previously described.

Bioinformatic analysis

Sequencing reads were base-called by Guppy (version3.2.2, Oxford Nanopore

Technologies, UK), and an initial quality filter was set to retain just the sequences with a Q-score ≥ 7 . The remaining reads were demultiplexed and trimmed using the Fastq 16S (Oxford Nanopore Technologies, UK) pipeline with default parameters. Filtered reads were initially annotated through Blastn against the NCBI RefSeq for 16S ribosomal RNA database using the EPI2ME software (Oxford Nanopore Technologies). For the assignment of each bacterial species, the 16S rRNA gene reads longer than 1,400 nt and with an accuracy above 85 % were considered for further analysis as previously described (Fujiyoshi et al., 2020; Heikema et al., 2020). A list of 124 bacterial pathogens was used as a reference to identify potential salmon pathogens (Table S1)(Austin et al., 2016) in sea lice microbiota. Species represented with less than ten reads were not considered in the final list of identified bacterial species. The frequency of each pathogenic species in the different sampled sites was calculated in R statistical software (R-Core-Team, 2020) and ordered as an Operational Taxonomic Unit (OTU) table. Simpson's and Shannon index were used to estimate alpha diversity, while Pielou's index was used to estimate evenness. All indexes were calculated using R's "Vegan" package (Dixon, 2003). These indexes evaluated the pathogenic diversity of the bacteria present in sea lice microbiota from the different sampled points. Finally, a phylogenetic tree was constructed based on the 16S rRNA gene obtained from the sequencing data. The tree was constructed using the software Geneious Prime (V. 2019.1.1), using the global alignment with free end gaps alignment type, a Jukes-Cantor genetic distance model, and a Neighbor-Joining tree build method (Saitou et al., 1987).

Results

This study was designed to explore and characterize bacterial pathogens in the sea lice-associated microbiota that could potentially impact salmon aquaculture. Herein, nanopore sequencing was used to obtain the full-length 16S rRNA (>1400 nt) sequence from sea lice collected in Atlantic salmon farms in three Chilean regions. After filtering and annotation, a total of 4.243.492 reads were obtained from all the sequenced points. Excluding the sampled zone 4 in Los Lagos, all sampled sites yielded over 500.000 reads; zone 6 had the most significant number of reads (945.750) (Table 1). Regarding the 16S rRNA reads that belonged to pathogenic bacterial species, a total of 333.666 reads were annotated, representing 7,89% among all reads. Through our analysis it was possible to identify 16S rRNA reads belonging to bacterial pathogens in the sea lice collected from all the seven sampled sites.

Table 1. Nanopore MinION full-16S rRNA throughput by region and sampled zones.

Region	Zone	Passed reads	Pathogenic reads	%Pathogenic reads by zone/total reads	%Pathogenic reads by zone/total pathogenic reads
Los Lagos	1	525.157	81.838	1,93	24,53
	2	681.379	93.650	2,21	28,07
	3	550.593	130.137	3,07	39,00
	4	365.234	178	0,00	0,05
Aysen	5	594.137	8.975	0,21	2,69
	6	945.750	17.355	0,41	5,20
Magallanes	7	581.242	1.533	0,04	0,46
	Total	4.243.492	333.666	7,86	100,00

Among the sampled zones, the more significant relative abundance of

pathogenic reads was found in Los Lagos, specifically in zone 3 (23.6 %), zone 1 (15.6 %), and zone 2 (13.7 %), while in Aysen, the abundance ranged from 1,63% (zone 5) to 1.8% (zone 6) (Fig 1A). In the Magallanes region, the relative abundance of pathogenic reads was 0.30%. The aquaculture productivity for each one of these regions is provided in Fig. 1B, evidencing that the larger productive pressure has been applied in Los Lagos, followed by Aysen and Magallanes regions.

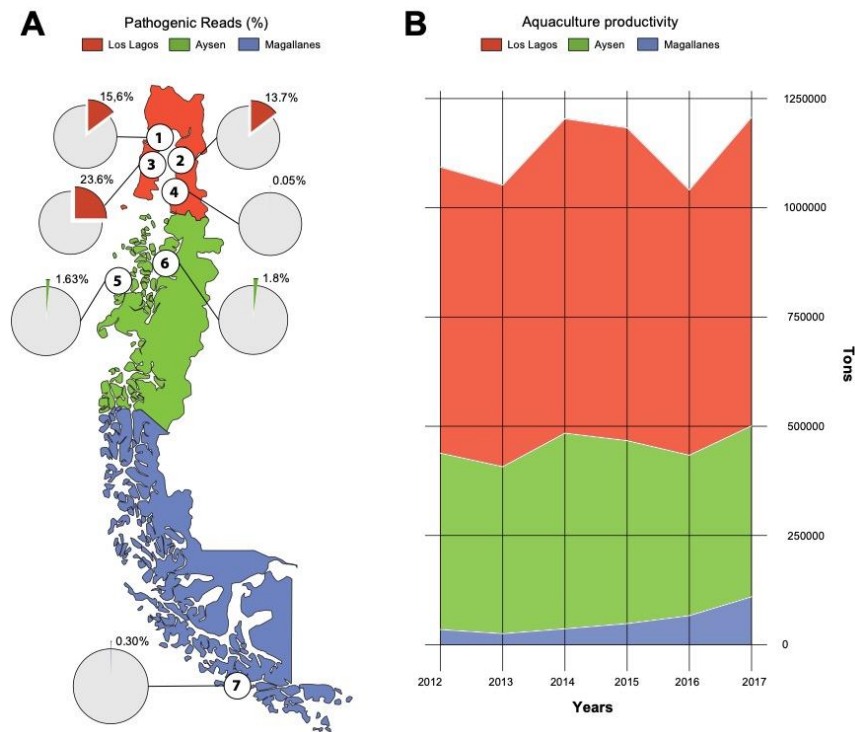


Figure 1. A) Map of southern Chile, indicating Los Lagos (red), Aysen (green) and Magallanes (blue) regions. The numbers represent the sampled zones where sea lice were collected and the pie chart the relative abundance of 16S rRNA reads belonging to pathogenic bacteria found for each zone. B) Aquaculture productivity (tons) reported by SERNAPESCA between 2012 to 2017, in Los Lagos, Aysen and Magallanes regions. Available at (<http://www.sernapesca.cl/informes/estadisticas>).

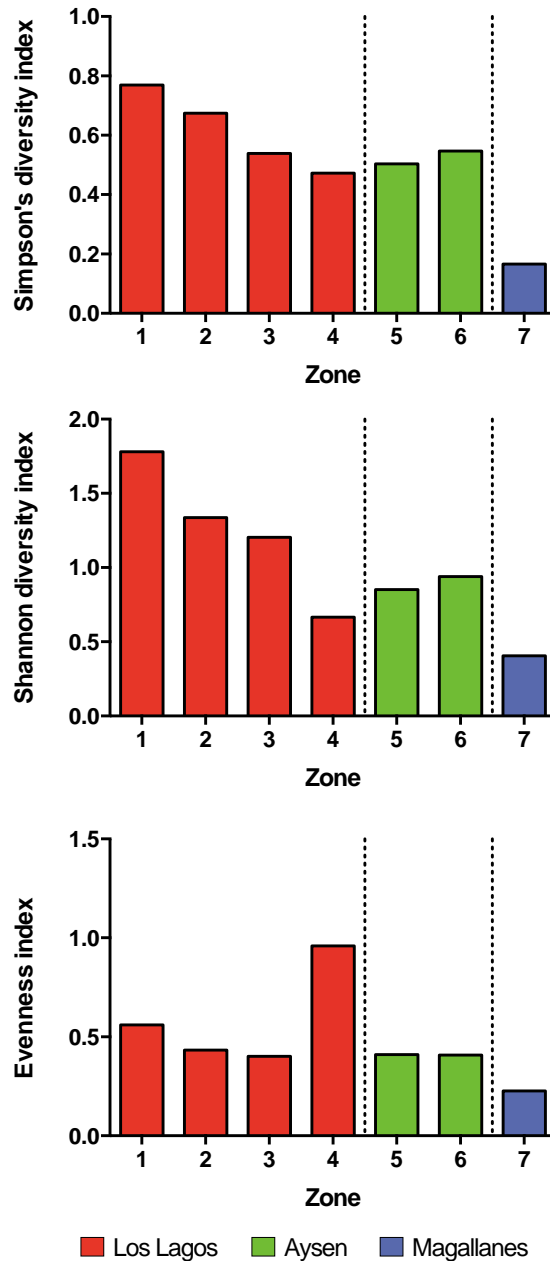


Figure 2. Pathogen biodiversity index estimated for the different sampled zones, including Simpson's, Shannon and Evenness index in Los Lagos (red), Aysen (green) and Magallanes (blue) regions.

Diversity (Simpson's and Shannon) and evenness (Pielou's) index were calculated to compare the different sampled sites. The results evidenced that C.

rogercresseyi pathogenic microbiota was more diverse in lice collected from Los Lagos followed by Aysen and less diverse in Magallanes. The more even zone was found in zone 4 in the Los Lagos region (Fig. 2).

A total of 7 genera, including 30 different potential fish pathogenic species, were identified in sea lice from the different sampled sites, including species from the *Vibrio* (14), *Tenacibaculum* (6), *Aliivibrio* (4), *Pseudoalteromonas* (2), *Moritella* (2) *Pseudomonas* and *Acinetobacter* (Table 2).

Table 2: Number of pathogens in the database (Austin, 2016), identified pathogens, reads, mean length and accuracy for the 16S rRNA reads annotated from *Caligus rogercresseyi*.

Genus	Pathogens		Reads	Mean length	Mean accuracy
	Database	Identified			
<i>Tenacibaculum</i>	7	6	200.265	1462	87,23
<i>Vibrio</i>	15	14	66.416	1490	86,56
<i>Aliivibrio</i>	4	4	66.091	1474	87,20
<i>Moritella</i>	2	2	536	1471	87,27
<i>Acinetobacter</i>	2	1	225	1461	87,55
<i>Pseudoalteromonas</i>	2	2	109	1457	86,52
<i>Flavobacterium</i>	10	1	14	1456	86,31
<i>Pseudomonas</i>	12	1	10	1449	87,46
Total	51	31	333.666	1476	86,87

The major taxonomic diversity of *Vibrio* species was identified in sea lice from the Los Lagos region, especially in the sampled zones 1, 2, and 3. In contrast, only two *Vibrio* species were identified in sea lice from Aysen and one from Magallanes, where *Vibrio splendidus* was the most frequent potential pathogen found in *C. rogercresseyi*. On the other hand, the sea lice collected from Aysen harbored the more extensive diversity of *Tenacibaculum* species (6 in total).

Among this genus, *Tenacibaculum ovolyticum* and *Tenacibaculum soleae* were identified in all the sampled zones, being *T. ovolyticum* the species with the most significant reads across all the identified pathogens. A core of five fish pathogens was present in all the regions, showing a higher average accuracy in 16S rRNA sequence to *Aliivibrio wodanis* (87,5%), *T. dicentrarchi* (87,7%), *T. ovolyticum* (87,9%), *T. soleae* (87,9%), and *V. splendidus* (87,6%) (Fig. 3).

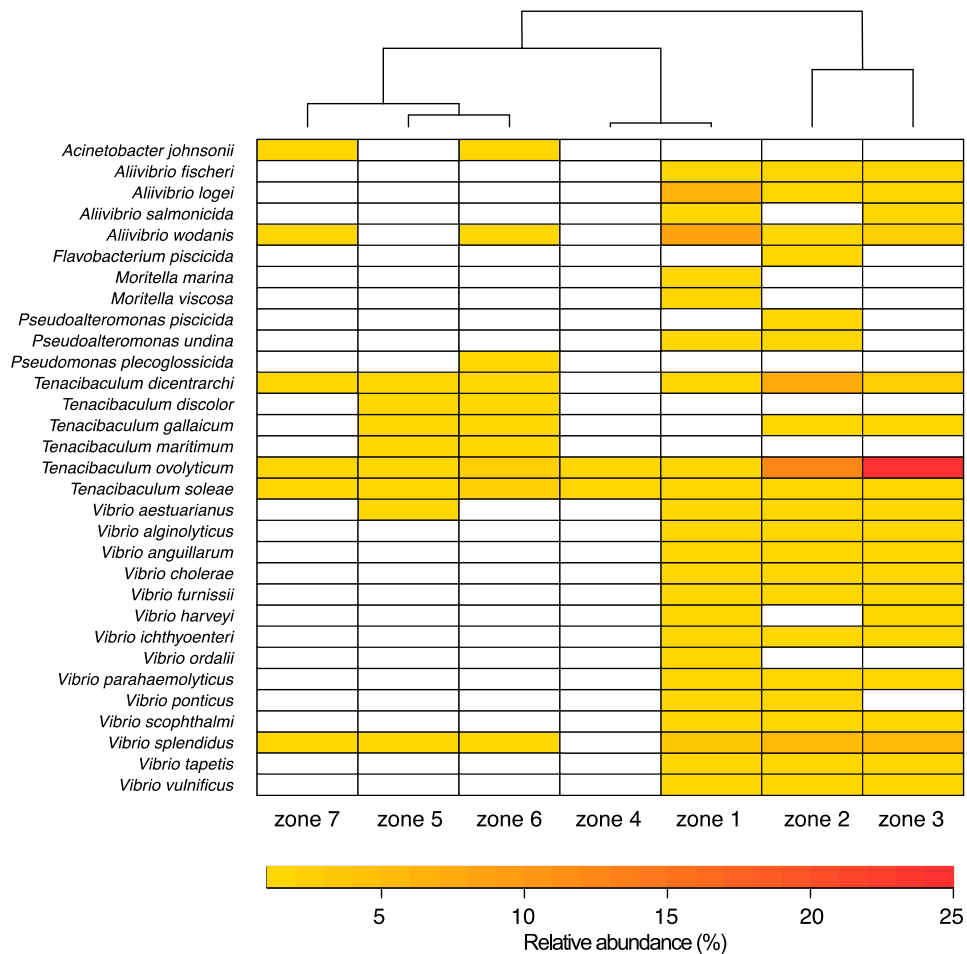


Figure 3. Heatmap with the relative abundance of 16S rRNA reads identified for different fish pathogens by the sampled zones in Los Lagos (1-4), Aysen (5 and 6) and Magallanes (7) regions. Color scale ranged from yellow to red and white boxes represents absence of reads for that particular pathogen in the different zones.

Finally, a phylogenetic tree was computed based on the near complete 16S rRNA gene. The results evidenced clear cluster of the main genera found in sea lice, *Vibrio* and *Tenacibaculum* (Fig. 4).

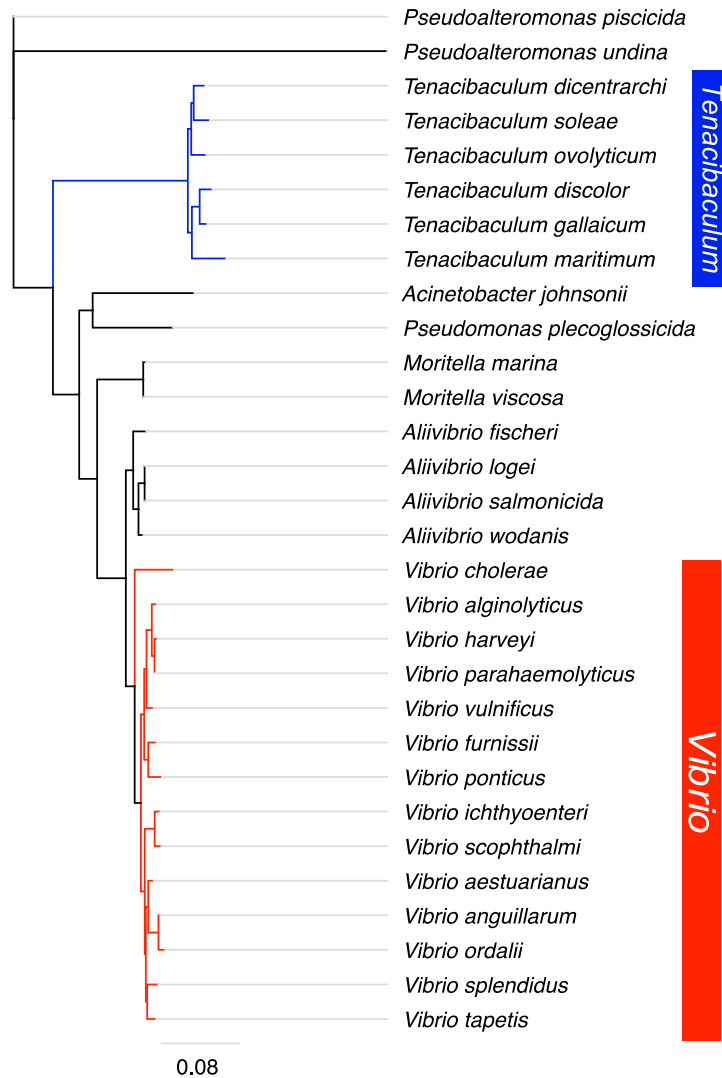


Figure 4. Phylogenetic tree constructed with the full 16S rRNA gene sequence for the 30 different fish pathogenic bacteria found in sea lice among all the sampled points. The tree was constructed using the free end gaps alignment type and a Jukes-Cantor genetic distance model with a Neighbor-Joining tree build method. *Vibrio* and *Tenacibaculum* clades are highlighted in red and blue respectively.

Discussion

Sea lice have become one of the major concerns for salmon aquaculture in Chile. On top of that, the recent evidence suggesting a large and diverse microbiota associated with the parasite makes it a priority to investigate possible new threats within this microbial community (Goncalves et al., 2020). In this scenario, this study was aimed to discover possible bacterial pathogens among *C. rogercresseyi* microbiota that could potentially impact salmon aquaculture. The 16S rRNA gene has been extensively used for bacterial species identification, mainly through amplifying and sequencing the variable regions V3 and V4. However, the evidence has suggested that sequencing just a fragment of the 16S rRNA gene might not be as accurate for species identification compared with the gene's complete sequence (Shin et al., 2016). In this context, the use of long-read sequencing technologies, like Nanopore, constitute a valuable tool to obtain the full-length 16S rRNA gene sequence for an accurate bacterial characterization at species or even strain level (Benitez-Paez et al., 2016; Fujiyoshi et al., 2020; Johnson et al., 2019; Shin et al., 2016).

The pathogenic component on the sea lice-associated microbiota was characterized using Nanopore sequencing. Herein, a list of 124 fish bacterial pathogens was used as a reference to identify potential salmon pathogens (Austin et al., 2016). The results evidenced that more pathogenic reads were found in *C. rogercresseyi* obtained from the Los Lagos regions, followed by Aysen and Magallanes. This finding may be explained due to the productive historical pressures that have been applied in the different regions (Quiñones et al., 2019). Historically, salmon aquaculture in Chile was focused on the Los Lagos Region, and just in the

latter 1990s, the industry slowly started to move southwards to Aysen and later to Magallanes (Iizuka et al., 2016).

Moreover, the first report of sea lice infesting Atlantic salmon in Magallanes was published just in 2019 (Arriagada et al., 2019b). In this scenario, the more significant number of pathogenic loads in sea lice from the Los Lagos region might result from a combination of productive pressures and environmental conditions that favor the growth of pathogenic bacteria in Los Lagos regions, including temperature and stocking density (Montes et al., 2022). Further investigations are needed to clarify the source of divergence regarding pathogenic bacteria present in sea lice among the different regions.

Regarding the different identified bacterial species in this study, the results evidence emergent and prevalent bacterial pathogens in salmon aquaculture worldwide. Among them, different *Vibrio* species were identified. *Vibrios* are highly abundant in aquatic ecosystems (i.e., marine coastal waters and sediments, and aquaculture setting), particularly in eutrophic environments, accounting for up to 14–45 % (i.e., 10^4 – 10^5 cells/mL) of the culturable microbiota in and/on marine organisms (Eilers et al., 2000; Thompson et al., 2004), including sea lice. Although the 16S rRNA gene in this genus evidence certain similarities between some species (Martins et al., 2013; Yu et al., 2020), filtering these reads by size has been used for specific species characterization (Fujiyoshi et al., 2020). Among all the species composing the *Vibrio* genus, 15 are considered fish pathogens as they can produce vibriosis on healthy fish (Austin B., 2016). The most predominant *Vibrio* species found in *C. rogercresseyi* was *V. splendidus*, which belongs to the Splendidus clade, one of the most predominant bacteria in cultured organisms (Romalde et al., 2014).

Molecular studies using the 16S rRNA gene and different housekeeping genes have demonstrated the genetic diversity and the polyphyletic nature of *V. splendidus*, even discriminating different novel species within the family *Vibrionaceae* (Thompson et al., 2005). This bacterium has been identified in salmon farms, affecting the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and cleaner fish (Austin, 2016), but mainly in other cultivable marine species such as Atlantic cod (*Gadus morhua*) (Reid et al., 2009), turbot (*Scophthalmus maximus*) (Macpherson et al., 2012); sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Austin B., 2016), among other. Nevertheless, vibriosis has not been a recurrent disease in Chilean salmon aquaculture in the last years (SERNAPESCA, 2019a; 2020c). The most-reported etiologic agent in Chilean farmed salmon populations is *Vibrio ordalii* (Toranzo et al., 2017), although *Vibrio spp.* has also been reported in Atlantic salmon and rainbow trout (SERNAPESCA, 2019b; 2020b). Furthermore, outbreaks have been reported in the red conger eel (*Genypterus chilensis*), a native marine fish species with high commercial demand, causing massive mortalities in post-larvae.

Another important genus found abundantly in sea lice microbiota was *Tenacibaculum*, regardless of the sampled zones. This genus comprises bacterial species responsible for the “tenacibaculosis”, a disease that affects salmonid cultured in Los Lagos, Aysen and Magallanes (SERNAPESCA, 2020a). Since the first reports of isolation and characterization of *Tenacibaculum* from farmed salmon in Chile (Avendano-Herrera et al., 2016), this disease has become a significant concern for salmon aquaculture, ranking second among infectious diseases affecting salmonids after Piscirickettsiosis caused by *Piscirickettsia salmonis*. Despite this prevalence, some authors have argued that the incidence of the

Tenacibaculum is underestimated due to the failure to recover *Tenacibaculum* species in microbiological media from field fish samples. Its demanding nutritional requirements and the correct identification of the etiological agent hinders the diagnosis of tenacibaculosis, even using PCR or genomic tools for species identification (Avendano-Herrera et al., 2019; Bridel et al., 2018; Nowlan et al., 2020). Through 16S rRNA gene sequencing our study, suggest that the microbiota of sea lice can harbor *Tenacibaculum* species such as *T. maritimum*, *T. ovolyticum*, *T. discolor*, and *T. dicentrarchi*, even suggesting the presence of *T. gallaicum* and *T. soleae*, which have not been previously reported in Chile. Here, our results provide a novel approach that can be used for a more accurate monitoring of the disease, but at the same time, reveals novel insight about the potential role of the sea lice as a reservoir, or even, a transmitting vector for *Tenacibaculum* species, However, further isolation of these microorganisms is needed in order to confirm our findings fully.

Our study also detected the Gram-negative bacterium *Moritella viscosa* (formerly *Vibrio viscosus* (Benediktsdottir et al., 2000), which is the causative agent of the winter ulcer diseases in cold water salmonid farming and lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) in the northern hemisphere (Einarsdottir et al., 2018; Grove et al., 2010), but it has never been reported in Chile. Affected fish primarily manifests as superficial skin lesions and then chronic skin and muscle ulcers, facilitating co-infection with other bacterial species such as *Tenacibaculum* spp. (Olsen et al., 2011) and *Aliivibrio wodanis* (Lunder et al., 2000). Precisely, these same microorganisms predominated in sea lice microbiota. All of them have in common the temperature in seawater in which they can survive and be maintained (i.e., below

15°C). These results should raise attention to the possible interaction between these species and the role of sea lice in the transmission of this pathogenic bacteria in salmon aquaculture.

In Chile, Piscirickettsiosis is widely distributed and presents high endemicity in two of the three farmed salmon regions (Avendano-Herrera, 2021). Interestingly, regarding the potential role of *C. rogercresseyi* as a vector for fish disease, previous efforts have not found evidence to support the role of sea lice in the transmission of *P. salmonis* (Labra et al., 2020). Our results using Nanopore 16S rRNA library preparation and sequencing confirm the absence of *P. salmonis* in sea lice, independent of the area sampled. However, the results also evidence that the spotlight should be placed on the transmission of other pathogenic bacteria beyond *P. salmonis*, especially those belonging to the *Tenacibaculum* genus. 16S gene sequencing provides a novel approach for a straightforward characterization of microbial communities. However, this approach lacks the potential to discriminate between live/dead bacteria or the pathogenic potential of a particular strain. In this regard, future experiments would benefit by including bacterial isolation and culture to complement these findings. The bacterial pathogens composition inhabiting sea lice microbiota should raise a major concern for the salmon aquaculture in Chile. Future studies using microbiological cultures must be conducted to isolate them and elucidate their role in the sea lice microbiota and its pathogenic potential for farmed fish.

Credit authorship contribution statement

María F. Morales-Rivera: Conceptualization, Formal analysis. Diego Valenzuela-

Miranda: Conceptualization, Formal analysis, Writing – review & editing. Valentina Valenzuela-Muñoz: Methodology. Gustavo Nuñez-Acuña: Methodology. Ruben Avendaño-Herrera: Writing – review & editing. Cristian Gallardo-Escárate: Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

This work was financed by the FONDECYT FONDAP (#15110027), FONDECYT POSTDOC (#3200600), and FONDECYT (#1210852).

References

- Arriagada, G., Hamilton-West, C., Nekouei, O., Foerster, C., Muller, A., Lara, M., Gallardo-Escarate, C., 2019a. *Caligus rogercresseyi* infestation is associated with *Piscirickettsia salmonis*-attributed mortalities in farmed salmonids in Chile. *Preventive Veterinary Medicine*. 171.
- Arriagada, G., Valenzuela-Muñoz, V., Arriagada, A.M., Núñez-Acuña, P., Brossard, M., Montecino, K., Lara, M., Gallardo, A., Gallardo-Escárate, C., 2019b. First report of the sea louse *Caligus rogercresseyi* found in farmed Atlantic salmon in the Magallanes region, Chile. *Aquaculture*. 512, 734386.
- Austin, B., Austin, D.A., 2016. *Bacterial Fish Pathogens*. Springer. 4.
- Austin B., A.D.A., 2016. *Vibrios*, *Bacterial Fish Pathogens*. Springer, Cham.
- Avendano-Herrera, R., 2021. Salmon aquaculture, *Piscirickettsia salmonis* virulence, and one health: Dealing with harmful synergies between heavy

- antimicrobial use and piscine and human health comment on Cabello and Godfrey (2019). *Aquaculture*. 532.
- Avendano-Herrera, R., Saldarriaga-Cordoba, M., Irgang, R., Tapia-Cammas, D., 2019. PCR protocol for *Tenacibaculum dicentrarchi*: updated specificity for "Tenacibaculum finnmarkense" detection. *B Eur Assoc Fish Pat.* 39, 162-171.
- Avendano-Herrera, R., Irgang, R., Sandoval, C., Moreno-Lira, P., Houel, A., Duchaud, E., Poblete-Morales, M., Nicolas, P., Ilardi, P., 2016. Isolation, Characterization and Virulence Potential of *Tenacibaculum dicentrarchi* in Salmonid Cultures in Chile. *Transbound Emerg Dis.* 63, 121-126.
- Benediktsdottir, E., Verdonck, L., Sproer, C., Helgason, S., Swings, J., 2000. Characterization of *Vibrio viscosus* and *Vibrio wodanis* isolated at different geographical locations: a proposal for reclassification of *Vibrio viscosus* as *Moritella viscosa* comb. nov. *Int J Syst Evol Micr.* 50, 479-488.
- Benitez-Paez, A., Portune, K.J., Sanz, Y., 2016. Species-level resolution of 16S rRNA gene amplicons sequenced through the MinION portable nanopore sequencer. *Gigascience.* 5, 4.
- Bienhold, C., Zinger, L., Boetius, A., Ramette, A., 2016. Diversity and Biogeography of Bathyal and Abyssal Seafloor Bacteria. *Plos One.* 11.
- Bridel, S., Olsen, A.B., Nilsen, H., Bernardet, J.F., Achaz, G., Avendano-Herrera, R., Duchaud, E., 2018. Comparative Genomics of *Tenacibaculum dicentrarchi* and "Tenacibaculum finnmarkens" Highlights Intricate Evolution of Fish-Pathogenic Species. *Genome Biology and Evolution.* 10, 452-457.
- Ciuffreda, L., Rodríguez-Pérez, H., Flores, C., 2021. Nanopore sequencing and its application to the study of microbial communities. *Computational and Structural Biotechnology Journal.* 19, 1497-1511.
- Clarridge, J.E., 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 17, 840-+.
- Dixon, P., 2003. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J Veg Sci.* 14, 927-930.

- Dresdner, J., Chavez, C., Quiroga, M., Jimenez, D., Artacho, P., Tello, A., 2019. Impact of *Caligus* treatments on unit costs of heterogeneous salmon farms in Chile. *Aquacult Econ Manag.* 23, 1-27.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Amann, R., 2000. Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look at cultivation-induced shifts. *Applied and Environmental Microbiology.* 66, 4634-4640.
- Einarsdottir, T., Sigurdardottir, H., Bjornsdottir, T.S., Einarsdottir, E., 2018. *Moritella viscosa* in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Fish Diseases.* 41, 1751-1758.
- Fast, M.D., 2014. Fish immune responses to parasitic copepod (namely sea lice) infection. *Developmental and Comparative Immunology.* 43, 300-312.
- Fujiyoshi, S., Muto-Fujita, A., Maruyama, F., 2020. Evaluation of PCR conditions for characterizing bacterial communities with full-length 16S rRNA genes using a portable nanopore sequencer. *Sci Rep-Uk.* 10.
- Gallardo-Escárate, C., Arriagada, G., Carrera, C., Gonçalves, A.T., Nuñez-Acuña, G., Valenzuela-Miranda, D., Valenzuela-Muñoz, V., 2019. The race between host and sea lice in the Chilean salmon farming: a genomic approach. *Reviews in Aquaculture.*
- Goncalves, A.T., Collipal-Matamal, R., Valenzuela-Munoz, V., Nunez-Acuna, G., Valenzuela-Miranda, D., Gallardo-Escarate, C., 2020. Nanopore sequencing of microbial communities reveals the potential role of sea lice as a reservoir for fish pathogens. *Sci Rep-Uk.* 10.
- Gonzalez, L., Carvajal, J., 2003. Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda : Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture.* 220, 101-117.
- Gonzalez, M.P., Marin, S.L., Vargas-Chacoff, L., 2015. Effects of *Caligus rogercresseyi* (Boxshall and Bravo, 2000) infestation on physiological response of host *Salmo salar* (Linnaeus 1758): Establishing physiological thresholds. *Aquaculture.* 438, 47-54.
- Grove, S., Wiik-Nielsen, C.R., Lunder, T., Tunsjo, H.S., Tandstad, N.M., Reitan, L.J., Marthinussen, A., Sorgaard, M., Olsen, A.B., Colquhoun, D.J., 2010.

- Previously unrecognised division within *Moritella viscosa* isolated from fish farmed in the North Atlantic. *Diseases of Aquatic Organisms*. 93, 51-61.
- Harrison, B.K., Myrbo, A., Flood, B.E., Bailey, J.V., 2018. Abrupt burial imparts persistent changes to the bacterial diversity of turbidite-associated sediment profiles. *Geobiology*. 16, 190-202.
- Heikema, A.P., Horst-Kreft, D., Boers, S.A., Jansen, R., Hiltemann, S.D., de Koning, W., Kraaij, R., de Ridder, M.A.J., van Houten, C.B., Bont, L.J., Stubbs, A.P., Hays, J.P., 2020. Comparison of Illumina versus Nanopore 16S rRNA Gene Sequencing of the Human Nasal Microbiota. *Genes-Basel*. 11.
- Iizuka, M., Roje, P., Vera, V., 2016. The Development of Salmon Aquaculture in Chile into an Internationally Competitive Industry: 1985–2007. In: Hosono A., Iizuka M., Katz J. (eds) *Chile's Salmon Industry*.
- Johnson, J.S., Spakowicz, D.J., Hong, B.Y., Petersen, L.M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S.R., Hanson, B.M., Agresta, H.O., Gerstein, M., Sodergren, E., Weinstock, G.M., 2019. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*. 10.
- Johnson, S.C., Treasurer, J.W., Bravo, S., Nagasawa, K., Kabata, Z., 2004. A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zool Stud*. 43, 229-243.
- Kerrigan, Z., Kirkpatrick, J.B., D'Hondt, S., 2019. Influence of 16S rRNA Hypervariable Region on Estimates of Bacterial Diversity and Community Composition in Seawater and Marine Sediment. *Frontiers in Microbiology*. 10.
- Labonte, J.M., Lever, M.A., Edwards, K.J., Orcutt, B.N., 2017. Influence of Igneous Basement on Deep Sediment Microbial Diversity on the Eastern Juan de Fuca Ridge Flank. *Frontiers in Microbiology*. 8.
- Labra, A., Bravo, S., Marshall, S.H., 2020. Defining the role of *Caligus rogercresseyi* in transmission and spreading of *Piscirickettsia salmonis*. *Aquaculture*. 528.
- Lunder, T., Sorum, H., Holstad, G., Steigerwalt, A.G., Mowinckel, P., Brenner, D.J., 2000. Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio viscosus* sp nov and *Vibrio wodanis* sp nov isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with 'winter ulcer'. *Int J Syst Evol Micr*. 50, 427-450.

- Macpherson, H.L., Bergh, O., Birkbeck, T.H., 2012. An aerolysin-like enterotoxin from *Vibrio splendidus* may be involved in intestinal tract damage and mortalities in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), and cod, *Gadus morhua* L., larvae. *Journal of Fish Diseases*. 35, 153-167.
- Martins, P., Cleary, D.F., Pires, A.C., Rodrigues, A.M., Quintino, V., Calado, R., Gomes, N.C., 2013. Molecular analysis of bacterial communities and detection of potential pathogens in a recirculating aquaculture system for *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis*. *PLoS One*. 8, e80847.
- Matsuo, Y., Komiya, S., Yasumizu, Y., Yasuoka, Y., Mizushima, K., Takagi, T., Kryukov, K., Fukuda, A., Morimoto, Y., Naito, Y., Okada, H., Bono, H., Nakagawa, S., Hirota, K., 2021. Full-length 16S rRNA gene amplicon analysis of human gut microbiota using MinION (TM) nanopore sequencing confers species-level resolution. *Bmc Microbiol*. 21.
- Mills, H.J., Reese, B.K., Shepard, A.K., Riedinger, N., Dowd, S.E., Morono, Y., Inagaki, F., 2012. Characterization of metabolically active bacterial populations in subseafloor Nankai Trough sediments above, within, and below the sulfate-methane transition zone. *Frontiers in Microbiology*. 3.
- Montes, R.M., Quiñones, R.A., Gallardo-Escárate, C., 2022. Disentangling the effect of sea temperature and stocking density on sea louse abundance using wavelets in a highly infested salmon farming area. *Aquaculture*. 546, 737246.
- Novak, C.W., Lewis, D.L., Collicutt, B., Verkaik, K., Barker, D.E., 2016. Investigations on the role of the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Caligidae), as a vector in the transmission of *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*. 39, 1165-1178.
- Nowlan, J.P., Lumsden, J.S., Russell, S., 2020. Advancements in Characterizing *Tenacibaculum* Infections in Canada. *Pathogens*. 9.
- Nygaard, A.B., Tunsjo, H.S., Meisal, R., Charnock, C., 2020. A preliminary study on the potential of Nanopore MinION and Illumina MiSeq 16S rRNA gene sequencing to characterize building-dust microbiomes. *Sci Rep-Uk*. 10.

- Oelckers, K., Vike, S., Duesund, H., Gonzalez, J., Wadsworth, S., Nylund, A., 2014. *Caligus rogercresseyi* as a potential vector for transmission of Infectious Salmon Anaemia (ISA) virus in Chile. *Aquaculture*. 420, 126-132.
- Olsen, A.B., Nilsen, H., Sandlund, N., Mikkelsen, H., Sorum, H., Colquhoun, D.J., 2011. *Tenacibaculum* sp. associated with winter ulcers in sea-reared Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 94, 189-199.
- Overton, K., Dempster, T., Oppedal, F., Kristiansen, T.S., Gismervik, K., Stien, L.H., 2019. Salmon lice treatments and salmon mortality in Norwegian aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*. 11, 1398-1417.
- Quiñones, R.A., Fuentes, M., Montes, R.M., Soto, D., León-Muñoz, J., 2019. Environmental issues in Chilean salmon farming: a review. *Reviews in Aquaculture*. 11, 375-402.
- R-Core-Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H.S., Perkins, D.L., 2016. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochem Bioph Res Co*. 469, 967-977.
- Reid, H.I., Treasurer, J.W., Adam, B., Birkbeck, T.H., 2009. Analysis of bacterial populations in the gut of developing cod larvae and identification of *Vibrio logei*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus* as pathogens of cod larvae. *Aquaculture*. 288, 36-43.
- Romalde, J.L., Dieguez, A.L., Lasa, A., Balboa, S., 2014. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Frontiers in Microbiology*. 4.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The Neighbor-Joining Method - a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4, 406-425.
- Sepulveda, F.A., Torres, J.F., Infante, C.D., Gonzalez, M.T., 2017. Potential role of ectoparasites (*Zeuxapta seriolae* and *Caligus lalandei*) in the transmission of pathogenic bacteria in yellowtail kingfish *Seriola lalandi*, inferred from

- cultivable microbiota and molecular analyses. *Journal of Fish Diseases*. 40, 979-985.
- SERNAPESCA, 2019a. Informe Sanitario Salmonicultura en Centros Marinos 2018. Gobierno de Chile. Available at <http://www.sernapesca.cl/informes/resultados-gestion>. .
- SERNAPESCA, 2019b. Reporte Período Enero - Diciembre 2017. Resultados Programa Sanitario Específico De Vigilancia De Peces Y Moluscos Y Reproductores Salmonídeos.
- Departamento De Salud Animal, Subdirección De Acuicultura Servicio Nacional De Pesca Y Acuicultura. Available at <http://www.sernapesca.cl/informes/resultados-gestion>. .
- SERNAPESCA, 2020a. INFORME SOBRE USO DE ANTIMICROBIANOS EN LA SALMONICULTURA NACIONAL. Valparaíso. Available at: <http://www.sernapesca.cl>.
- SERNAPESCA, 2020b. Reporte Período Enero - Diciembre 2019. Resultados Programa Sanitario Específico De Vigilancia De Peces Y Moluscos Y Reproductores Salmonídeos. Gobierno de Chile. Available at <http://www.sernapesca.cl/informes/resultados-gestion>. .
- SERNAPESCA, 2020c. Informe Sanitario De Salmonicultura En Centros Marinos Año 2019. Gobierno de Chile. Available at http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/informe_sanitario_salmonicultura_2019_final_julio_2020.pdf (accessed 10 October 2020), Valparaíso.
- Shin, J., Lee, S., Go, M.J., Lee, S.Y., Kim, S.C., Lee, C.H., Cho, B.K., 2016. Analysis of the mouse gut microbiome using full-length 16S rRNA amplicon sequencing. *Sci Rep*. 6, 29681.
- Thompson, F.L., Iida, T., Swings, J., 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol R*. 68, 403-+.
- Thompson, F.L., Gevers, D., Thompson, C.C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C.B., Swings, J., 2005. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 5107-5115.

- Toranzo, A.E., Magarinos, B., Avendano-Herrera, R., 2017. Vibriosis: *Vibrio anguillarum*, *V. ordalii* and *Aliivibrio salmonicida*. *Fish Viruses and Bacteria: Pathobiology and Protection*, 314-333.
- Urbinati, E.C., Zanuzzo, F.S., Biller, J.D., 2020. Stress and immune system in fish. *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*, 93-114.
- Valenzuela-Miranda, D., Gonçalves, A.T., Valenzuela-Muñoz, V., Nuñez-Acuña, G., Liachko, I., Nelson, B., Gallardo-Escarate, C., 2022. Proximity ligation strategy for the genomic reconstruction of microbial communities associated with the ectoparasite *Caligus rogercresseyi*. *Sci Rep-Uk*. 12, 783.
- Valenzuela-Munoz, V., Boltana, S., Gallardo-Escarate, C., 2016. Comparative immunity of *Salmo salar* and *Oncorhynchus kisutch* during infestation with the sea louse *Caligus rogercresseyi*: An enrichment transcriptome analysis. *Fish Shellfish Immun.* 59, 276-287.
- Walde, C.S., Jensen, B.B., Pettersen, J.M., Stormoen, M., 2021. Estimating cage-level mortality distributions following different delousing treatments of Atlantic salmon (*salmo salar*) in Norway. *Journal of Fish Diseases*. 44, 899-912.
- Yu, J., Zhu, B., Zhou, T., Wei, Y., Li, X., Liu, Y., 2020. Species-specific Identification of *Vibrio* sp. based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer. *J Appl Microbiol.* 129, 738-752.

Supporting Information

Tabla S1. List of fish pathogens (Austin, 2016)

	Genus	Specie	Taxid
1	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	40214
2	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	28090
3	<i>Aerococcus</i>	<i>Aerococcus viridans</i>	1377
4	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	656
5	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas bestiarum</i>	105751
6	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	648
7	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas dhakensis</i>	196024
8	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	644
9	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas jandaei</i>	650
10	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	645
11	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	646
12	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas veronii</i>	654
13	<i>Aliivibrio</i>	<i>Aliivibrio logei</i>	688
14	<i>Aliivibrio</i>	<i>Aliivibrio salmonicida</i>	40269
15	<i>Aliivibrio</i>	<i>Aliivibrio wodanis</i>	80852
16	<i>Aliivibrio</i>	<i>Aliivibrio fischeri</i>	668
17	<i>Aquaspirillum</i>	<i>Aquaspirillum</i> sp	1872580
18	<i>Arcobacter</i>	<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	28198
19	<i>Carnobacterium</i>	<i>Carnobacterium piscicola</i>	1255596
20	<i>Chlamydia</i>	<i>Chlamydia</i>	810
21	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Chryseobacterium aahli</i>	1278643
22	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	546
23	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium botulinum</i>	1491
24	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium tarantellae</i>	39493
25	<i>Delftia</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	80866
26	<i>Edwardsiella</i>	<i>Edwardsiella anguillarum</i>	1821960
27	<i>Edwardsiella</i>	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	67780
28	<i>Edwardsiella</i>	<i>Edwardsiella piscicida</i>	1263550
29	<i>Edwardsiella</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	636
30	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	550
31	<i>Erysipelothrix</i>	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	1648
32	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia vulneris</i>	566
33	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	55197

Tabla S1. (Continuation 1)

	Genus	Specie	Taxid
34	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium columnare</i>	996
35	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium hydatis</i>	991
36	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	986
37	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium oncorhynchi</i>	728056
38	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium piscicida</i>	43662
39	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	96345
40	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i> sp	239
41	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium spartansii</i>	1278819
42	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium succinicans</i>	29536
43	<i>Flectobacillus</i>	<i>Flectobacillus roseus</i>	502259
44	<i>Francisella</i>	<i>Francisella noatunensis</i>	657445
45	<i>Francisella</i>	<i>Francisella</i> sp	2047875
46	<i>Hafnia</i>	<i>Hafnia alvei</i>	569
47	<i>Hahella</i>	<i>Hahella chejuensis</i>	158327
48	<i>Halomonas</i>	<i>Halomonas cupida</i>	44933
49	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Janthinobacterium lividum</i>	29581
50	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	573
51	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus garvieae</i>	1363
52	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	1358
53	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus piscium</i>	1364
54	<i>Moritella</i>	<i>Moritella marina</i>	90736
55	<i>Moritella</i>	<i>Moritella viscosa</i>	80854
56	<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	1766
57	<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>	1781
58	<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium</i> sp.	1763
59	<i>Mycoplasma</i>	<i>Mycoplasma mobile</i>	2118
60	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	1824
61	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia crassostreae</i>	53428
62	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia seriolae</i>	37332
63	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	549
64	<i>Pasteurella</i>	<i>Pasteurella piscicida</i>	38294
65	<i>Pasteurella</i>	<i>Pasteurella skyensis</i>	97481
66	<i>Photobacterium</i>	<i>Photobacterium damsela</i>	38293
67	<i>Piscirickettsia</i>	<i>Piscirickettsia salmonis</i>	1238

Tabla S1. (Continuation 2)

	Genus	Specie	Taxid
68	<i>Plesiomonas</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	703
69	<i>Providencia</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	587
70	<i>Providencia</i>	<i>Providencia vermicola</i>	333965
71	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	43662
72	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas undina</i>	43660
73	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	287
74	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	43263
75	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	53406
76	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas baetica</i>	674054
77	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	587753
78	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	294
79	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i>	198620
80	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas luteola</i>	47886
81	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas mosselii</i>	78327
82	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	70775
83	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	301
84	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	303
85	<i>Renibacterium</i>	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	1646
85	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella enterica</i>	28901
87	<i>Serratia</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	614
88	<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>	615
89	<i>Serratia</i>	<i>Serratia plymuthica</i>	82996
90	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>	24
91	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	40324
92	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1311
93	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1334
94	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus ictaluri</i>	380397
95	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus iniae</i>	1346
96	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus milleri</i>	33040
97	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus parauberis</i>	1348
98	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus phocae</i>	119224
99	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum dicentrarchi</i>	669041
100	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum discolor</i>	361581
101	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum finnmarkense</i>	1680763

Tabla S1. (Continuation 3)

	Genus	Specie	Taxid
102	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum gallaicum</i>	561505
103	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	107401
104	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum ovolyticum</i>	104270
105	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum soleae</i>	447689
106	<i>Vagococcus</i>	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	2739
107	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio aestuarianus</i>	28171
108	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	663
109	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	55601
110	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	666
111	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio furnissii</i>	29494
112	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	669
113	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio ichthyenteri</i>	142461
114	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio mimicus</i>	674
115	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio ordalii</i>	28174
116	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	670
117	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio ponticus</i>	265668
118	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio scophthalmi</i>	45658
119	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio splendidus</i>	29497
120	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio tapetis</i>	52443
121	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	672
122	<i>Weissella</i>	<i>Weissella ceti</i>	759620
123	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia intermedia</i>	631
124	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	29486

CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN GENERAL

Para evitar la aparición de posibles enfermedades es fundamental obtener información sobre los posibles escenarios (Engering et al., 2013). El análisis taxonómico y funcional de la comunidad microbiana en el intestino de peces de los diferentes sistemas, permitió evaluar la presencia de potenciales patógenos y posibles responsables de enfermedad. Además, nos permitió evaluar bajo que condiciones hay una mayor diversidad en la comunidad.

En el capítulo IV de nuestro trabajo, determinamos la taxonomía y análisis funcional de la microbiota del intestino de peces en un sistema RAS en cuyo estanque se presentó aumento de la mortalidad luego de un proceso de vacunación. La vacunación es uno de los procedimientos profilácticos más efectivos para reducir la incidencia de brotes en la acuicultura (Makesh et al., 2022). A pesar de que las vacunas son seguras, existen ciertos riesgos que deben ser considerados. La vacuna reportada por la empresa con posterioridad es una vacuna inyectable, viva atenuada. Además, el proceso de vacunación se realizó mediante pistola de vacunación automática. Para el caso de las vacunas vivas atenuadas, existe la posibilidad de que muestren una virulencia residual, sean virulentos en los vacunados inmunocomprometidos o la pequeña posibilidad de contaminación con un organismo no deseado (Ma et al., 2019). Por otro lado, el mayor desafío de la vacunación es la administración a un gran número de individuos (Makesh et al., 2022). En ese sentido, la vacunación por inyección intramuscular o intraperitoneal ofrece la mejor protección (Ma et al., 2019). Sin embargo, la manipulación e inyección causa estrés en los peces y el uso de anestésicos requiere de un periodo

de resguardo previo a la comercialización (Makesh et al., 2022). Además, la vacunación inicialmente produce efectos inmunosupresores y reduce la población de linfocitos producto de la liberación elevada de cortico esteroides, ejercida inmediatamente después de la vacunación (Makesh et al., 2022). Estos factores podrían ser claves en la aparición de un brotes en el sistema. Por otro lado, la aparición de granulomas sistémico en los peces corresponde a la sintomatología clínica de varios patógeno, como, por ejemplo, *Renibacterium salmoninarum*, *Fracsella philomiragia*, *Exophiala salmonis* y *Mycobacterum* Sp. (Aro et al., 2014). La cual era la sintomatología clínica de los peces del RAS. Sin embargo, sólo *E. salmonis* fue morfológicamente sugerida, por lo que podría responder al origen del brote. Con respecto a los otros patógenos, no fueron detectados ni en los análisis de PCR, ni en las muestras de intestino de los peces. En la secuenciación del ARNr 16S de las muestras de intestino de los peces con y sin distensión abdominal nos encontramos con gran abundancia de *Aeromonas* (sin distensión), y *Aliivibrio wodanis* (con distensión). Las abundancias por sobre el 60% de *Alii. Vibrio* es de especial interés. Sin embargo, es necesario evaluar la microbiota de la piel para catalogar a este microorganismo como patógeno primario o secundario y descartarlo o no responsable de contaminación durante el proceso de vacunación. Además, en la literatura se ha mencionado que las muestras de agua y piel se recomiendan como las mejores muestras para la detección temprana de patógenos en RAS (Drønen et al., 2022). Cabe destacar que la presencia de *Alii. wodanis* también fue encontrada en la muestra de agua procedente de la salida del biofiltro. Como se mencionó en el capítulo IV, las co-infecciones son comunes en la naturaleza y pueden responder a la presencia de una infección con dos patógenos

primarios o a una infección con un patógeno primario y luego un secundario (Kotob et al., 2016). Las co-infecciones provocan un aumento en la mortalidad en comparación a las infecciones causadas por un solo agente (Wise et al., 2021). Existen reportes de co-infecciones de *Alii. wodanis* con *Moritella viscosa* (responsable de las úlceras de invierno), en las cuales *Alii. wodanis* termina inhibiendo a su competidor para ser el principal patógeno durante el transcurso de la enfermedad (Hjerde et al., 2015; Karlsen et al., 2014). Recientemente se ha informado que los principales géneros microbianos encontrados en heridas de piel en RAS post-smolt marino son *Tenacibaculum*, *Moritella*, *Aliivibrio*, *Francicella* y *Psychrobacter* (Drønen et al., 2022). Sin embargo, estos microorganismos no coinciden con la sintomatología clínica reportada en nuestro RAS de agua dulce. Por otro lado, la columna de agua también posee gran diversidad de microorganismos comunes que son característicos en acuicultura (capítulo IV). Microorganismos como *Francisella*, *Mycobacterium* y *Psychrobacter* han sido reportados por medio de técnicas de secuenciación de ARNr 16S en RAS de agua de mar (Drønen et al., 2022). Conjuntamente, los microbiomas acuáticos se pueden establecer grupos de varios patógenos, junto con otros microorganismos acuáticos (principalmente microalgas procariontas y eucariotas), que pueden producir toxinas y afectar el sistema (Marmen et al., 2021). Además, según nuestro estudio, otros parásitos como los piojos de mar, podrían actuar como vectores biológicos de enfermedad (Capítulo VI). Enfermedades emergentes como la tenacibaculosis han ganado lugar en los reportes de mortalidad por agentes infecciosos en Chile (Sernapesca, 2018, 2021b). Una enfermedad emergente se define como aquella cuya incidencia aumenta respecto a (i) un patógeno en un huésped nuevo; (ii) un

patógeno con rasgos nuevos dentro del mismo huésped; y (iii) un complejo de enfermedades que se traslada a un área geográfica nueva. Los primeros reportes de tenacibaculosis datan de 2010 (Avendaño-Herrera et al., 2020). Sin embargo, no es hasta 2017 que se observa un considerable aumento (Sernapesca, 2018).

Por otro lado, en nuestro trabajo estudiamos la diversidad microbiana durante la transferencia al agua de mar (Capítulo V). Gracias a ello, pudimos determinar que los peces sometidos al gradiente salino presentan mejores índices de diversidad que los que no. Como mencionamos en dicho capítulo, una menor diversidad es indicativo de una disbiosis de la microbiota (Ofek et al., 2022; Valdes et al., 2018). Sin embargo, al evaluar el crecimiento de los peces, observamos que no hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Anexo capítulo V: Tabla A1, Figura A1A). En cambio, si se observan diferencias significativas a través del tiempo. Lo que es indicativo de que los peces efectivamente están aumentando de peso bajo las diferentes condiciones y esto es lo que finalmente importa a los productores. Estos resultados contrastan a los publicados por Fossmark et al. (2021), uno de los únicos estudios encontrados sobre cambio gradual de salinidad en Salmón del Atlántico. En dicho estudio se presentó una disminución en el peso final de los peces luego de un año de crecimiento frente a un cambio gradual en la salinidad. Sin embargo, la mortalidad de los peces sometidos al cambio gradual disminuye a la mitad en comparación al grupo sometido directamente al shock osmótico (Fossmark et al., 2021). Lo que es un indicativo de un mejor bienestar animal (Oliveira et al., 2021). En nuestro estudio no fue posible determinar esto, producto del número de peces dispuestos para el experimento. Por otro lado, en el mismo experimento de Fossmark et al. (2021) , informan que la diversidad

microbiana no se ve afectada significativamente en comparación a los otros tratamientos. Sin embargo, es necesario señalar que cada cambio de salinidad en aquel experimento se realizó en más o menos la mitad del tiempo en la cual fue realizado el nuestro. El establecimiento de la microbiota puede ser mayor al tiempo en que transcurrió el experimento, esto hace que la diversidad microbiana cambie (Milligan-Myhre et al., 2016). Con respecto a la de los cambios nutricionales de los peces con el factor K de Fulton, podemos señalar que todos los valores son superiores a 1 en todos los casos y no se presentan diferencias significativas entre los tratamientos ni entre los tiempos (Jin et al., 2015; Ovegård et al., 2012) (Anexo capítulo V: Tabla A1, Figura A1B). Sin embargo, no se encontraron comparativos en literatura que trabajen con datos de secuenciación factor de Fulton. Por otro lado, los niveles de expresión de la bomba Na^+/K^+ -ATPase son utilizados como marcadores de esmoltificación en los peces (Valenzuela-Muñoz et al., 2021). En ese sentido, se ha estudiado que los transcriptos de la subunidad alpha, en particular la isoforma 1a, disminuyen durante la transición de agua dulce a agua salada (Madsen et al.; Robertson & McCormick, 2012; Valenzuela-Muñoz et al., 2021). En cuanto a la expresión relativa de la subunidad beta de la bomba Na^+/K^+ -ATPase, aumenta a medida que aumenta la salinidad (Robertson & McCormick, 2012). Esta subunidad es esencial para la estabilización de la subunidad alpha, la orientación de la membrana y la maduración estructural y funcional de la bomba (Madsen et al., 2009). En nuestro análisis la expresión de ambas subunidades coinciden con lo reportado. Es más, la expresión de la subunidad beta de los peces sometidos al cambio gradual de la salinidad y a los alimentados previamente con la dieta funcional son mayores que los sometidos al shock térmico. Esto puede tener

directa relación con que los dos primeros tratamientos podrían estar mejorando la adaptación de los peces al agua salada.

En cuanto al uso de herramientas de secuenciación de tercera generación para el estudio taxonómico, existen una serie de ventajas que fueron mencionadas en nuestro trabajo (capítulos IV, V y VI). Una de las grandes ventajas, es que los tamaños de lectura hacen posible que la identificación sea más precisa. Razones discutidas en los capítulos IV y V. En este trabajo se exploraron metodologías de análisis secuencia por secuencia (Epi2Me) y sistemas de agrupación de secuencias (NanoCLUST). El análisis secuencia por secuencia nos permitió clasificar los datos en función de los mejor valores de precisión para la asignación taxonómica de cada secuencia. Esto facilitó la clasificación a niveles taxonómicos superiores. Por otro lado, NanoCLUST agrupa lecturas de ARNr 16S completo, clasificando taxonómicamente la través una secuencia representativa de cada grupo o “cluster” (Rodriguez-Perez et al., 2021). Entonces en nuestro trabajo, al utilizar la herramienta NanoCLUST la asignación de especie fue mucho menor. Esto debido a que la agrupación de secuencias es susceptible de pasar por alto la identificación de las especies que realmente están presentes en el conjunto de datos o a clasificar erróneamente otras por deficiente precisión en la clasificación (Curry et al., 2022; Jung & Chorlton, 2021). Otras herramientas posteriores a nuestro análisis aparecieron prometiendo mejorar estas falencias. Adicionalmente, encontramos en literatura otras limitaciones con respecto a la estandarización de la técnica que podrían ser exploradas con mayor profundidad. Como se mencionó en el capítulo V, se ha descrito que en un núcleo microbiano pre-establecido, la abundancia relativa de cada una de las especies se puede ver afectada por la *Taq* polimerasa

que se utiliza en el momento de preparar las muestras o incluso por la base de datos utilizada (Rozas et al., 2021). Lo mismo sucede con el método de extracción y la eliminación de microorganismos contaminantes (Cusco et al., 2018; Li et al., 2021; Mann et al., 2021; Matsuo et al., 2021). Por ejemplo, Li *et al.* basa su eliminación de contaminantes en la secuenciación de los controles negativos, tanto del proceso de extracción como de amplificación (Li et al.). El establecimiento de una comunidad microbiana simulada sería útil para la estandarización de la técnica en salmón del Atlántico y obtener una mejor representatividad de la abundancia de cada especie. Esto debido a que cada muestra es diferente, física y microbiológicamente por lo que es necesario un estándar para uniformar la técnica (Highlander, 2013). En nuestro estudio, utilizamos una comunidad microbiana simulada comercial en la cual solo 3 especies son representativas de la comunidad microbiana de nuestro estudio. Para determinar cuales podrían ser los integrantes de esa comunidad simulada es necesario realizar comparaciones. Entre las muestras de intestino, tanto en el trabajo de microbiota intestinal en RAS, como en el estudio de transferencia al agua de mar, los géneros más abundantes que frecuentan en ambos estudios son *Flavobacterium*, *Arcobacter*, *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Vibrio*. Estos podrían ser los microorganismos característicos de la microbiota del intestino del Salmón del Atlántico en Chile. Al comparar con otros RAS encontrados en literatura, coinciden con nuestro trabajo los géneros *Aeromonas*, *Streptococcus*, *Aliivibrio* y *Photobacterium*. Además, géneros no clasificados del orden *Burkholderiales* y *Enterobacteriaceae* (Dehler et al., 2017; Huyben et al., 2020; Li et al., 2021; Lorgen-Ritchie et al., 2021). Por los que estos microorganismos podrían ser la base de un núcleo microbiano en un RAS.

Por otro lado, nuestro trabajo es uno de los pocos que evalúa la microbiota intestinal del salmón del Atlántico mediante la secuenciación del ARNr 16S completo mediante herramientas de secuenciación de tercera generación. La gran mayoría de los trabajos utiliza herramientas de segunda generación (Drønen et al., 2022; Fossmark et al., 2021; Huyben et al., 2020; Li et al., 2021). Uno de los pocos artículos que trabajan con tecnología Nanopore en salmón del Atlántico, se enfoca en secuenciar aislados aerobios cultivables, esto como tecnología para la identificación de microorganismos durante el procesamiento de alimentos (Bjørge Thomassen et al., 2023). Esto muestra la versatilidad de esta técnica en las diferentes áreas del ciclo productivos. A pesar de que este trabajo solo considera la microbiota aerobia cultivable de interés productivo, aquel trabajo pudo establecer que la mayoría de los aislados pudo clasificarse a nivel de especie (Bjørge Thomassen et al., 2023).

Pasando a la utilizad de la asignación taxonómica a nivel de la predicción funcional del microbioma, podemos señalar que la predicción funcional basada en amplicones podría estar sesgada por la cantidad de genomas de referencias existentes. Sin embargo, esta limitación ha ido disminuyendo a medida que aumenta la cantidad de genomas disponibles (Douglas et al., 2020). El estudio del perfil funcional de la microbiota es una poderosa herramienta para, por ejemplo, el estudio del efecto de la piscicultura en el ecosistema (Laroche et al., 2021). El análisis del metagenoma de la comunidad microbiana nos permite evaluar distintas vías funcionales. Incluido aquellas que tienen relación con productos nocivos que pueden acumularse en el RAS en el transcurso del tiempo (Capítulo IV). Además, brinda información importante sobre potenciales riesgos de la comunidad

microbiana presente. Por ejemplo, nos entrega los factores de virulencia presentes en la comunidad microbiana (Pattaroni et al., 2018). El establecimiento efectivo de las bacterias a un hospedero depende de proteínas codificadas por los genes de virulencia (Kazmierczak et al., 2005). Como pudimos ver en el capítulo IV, De los 10543 KOs disponibles en PICRUSt2, en el estudio de RAS se detectaron 6785 (Douglas et al., 2020). Además, de esos datos, logramos identificar 546 KOs que corresponden a factores de virulencia (Anexo capítulo IV: Tabla A1). En dicha tabla, observamos que todas las muestras provenientes de las columnas de agua poseen una gran abundancia relativa del KO K03088 (Anexo capítulo IV: Figura A1). El KO K03088 esta vinculado con la familia factor sigma 70 (gen *RpoE*), respuesta al estrés bacteriano, que determina la supervivencia al interior de macrófagos y gobierna la producción de sideróforos que promueven el crecimiento bacteriano en el entorno del hospedero (Grove, 2022; Kazmierczak et al., 2005; Todor et al., 2020). Por lo que la gran abundancia relativa de este factor de virulencia en cada una de las muestras de la columna de agua podría ser debido a que la composición de población microbiana presente pueda establecerse a pesar de las condiciones fluctuantes del RAS. Aunque existen diferencias entre los microorganismos presentes en la columna de agua a que se presentan en el intestino, estos podrían ser un foco infeccioso en la piel. En cambio, los patógenos podrían estar en intestino debido al alimento. Esto tanto en la superficie inanimada como animada. Los microorganismos patógenos pueden entrar al huésped por la pie, las branquias y el intestino. En particular, tanto en branquias como en intestino, *Aeromonas salmonicida* podría estar colonizando al mismo tiempo (Du et al., 2019). Por lo que la presencia de este patógeno en las muestras de agua es un factor que debería

ser monitoreado. A pesar de que este estudio no se enfocó en la microbiota de la piel, otros trabajos han informado que la composición de la microbiota de la columna de agua en un RAS mas similar a la microbiota de las muestras de piel que de intestino (Minich et al., 2020). Por otro lado, los peces con distensión abdominal presentan gran abundancia de *Alii. wodanis*. La distensión abdominal aumenta los riesgos de muerte producto que conduce a una contaminación frecuente de la vejiga natatoria (Anderson, 2006). En nuestro trabajo esto tiene directa relación con la disminución en la abundancia relativa de los microorganismos de las muestras de intestino que presentan este problema. Si la respuesta inflamatoria se ve superada por supresión del sistema inmune o volumen de microorganismos invasores en la distensión abdominal, conllevan a la septicemia que puede ocasionar la muerte de los peces (Anderson, 2006). Lama la atención, que este microorganismo fue encontrado en la microbiota de *C. rogercresseyi*. Por lo que este microorganismo podría estar presente durante todo el ciclo productivo.

Finalmente, en el proceso de engorda de los peces nos encontramos con una serie de patógenos que provocan enfermedades en los salmones del Atlántico en Chile. Los primeros lugares de enfermedades bacterianas son ocupados por la tenacibaculosis y la piscirickettsiosis (Sernapesca, 2021b). La expansión de la tenacibaculosis ha afectado a diversas especies de peces, no solo al salmón del Atlántico (Avendaño-Herrera et al., 2020). En nuestro trabajo, la mayor cantidad de lecturas de potenciales patógenos de peces encontradas en la microbiota de *C. rogercresseyi* corresponden a especies del género *Tenacibaculum* (Capítulo VI). Además de los brotes en salmón del Atlántico, se describe la aparición de *Tenacibaculum dicentrarchi* en especies como el congrio rojo (*Genypterus chilensis*)

(Irgang et al., 2017). Por otro lado, esta especie presenta mortalidad en ensayos experimentales tanto en salmón del Atlántico como en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Avendaño-Herrera et al., 2016). Por otro lado "*Tenacibaculum finnmarkense*" se ha aislado tanto en salmón coho como en trucha arcoíris (Avendaño-Herrera et al., 2020). Lamentablemente, al ser una especie que aun no está válidamente publicada, no fue incluida en nuestros análisis.

En resumen, si bien existe complejidad en establecer el rol general de la estructura taxonómica y funcional parámetros de una mejor salud general. Sin embargo, esta tesis logró establecer que hay una disminución en la abundancia relativa en los peces con signos clínicos de enfermedad (Capítulo IV). Lo que coincide con lo reportado por Ofek et al. (2022) en estudios de tilapia. Además, ciertas condiciones, como un cambio gradual en la salinidad y la complementación con dietas funcionales permiten que se desarrolle una mayor diversidad de la microbiota. Lo cual es indicativo de una mejor salud. Por otro lado, la presencia de potenciales patógenos en vectores biológicos en los sistemas de recirculación y jaulas aumenta los riesgos de la adquisición de enfermedades infecciosas bajo condiciones de estrés, lo que se traduce en una reducción del estado de salud de los peces.

CONCLUSIONES

1. La microbiota intestinal del salmón del Atlántico es diversa, siendo los géneros predominantes en este estudio *Flavobacterium*, *Arcobacter*, *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Vibrio*.
2. En peces con distensión abdominal disminuye la diversidad de especies, predominando microorganismos patógenos como *Aliivibrio wodanis*.
3. Los peces sin distensión abdominal poseen una mayor contribución en las vías relacionadas con metabolismo de aminoácidos y fermentación de ácidos grasos de cadena corta, lo que es indicativo de una mejor salud con respecto a los que si poseen distensión abdominal.
4. Un cambio gradual en la salinidad de los *smolt* en la etapa de transferencia al agua de mar favorece la diversidad microbiana.
5. Complementar con una dieta funcional previo a la transferencia al agua de mar, favorece el metabolismo de aminoácidos en comparación a los otros tratamientos.
6. La evaluación de la microbiota patógena de *Caligus rogercresseyi* permite la detección temprana de potenciales patógenos que pueden afectar al salmón del Atlántico durante el proceso de engorda en agua de mar.

PROYECCIONES

Por un lado, se requieren mas estudios funcionales para determinar si el cambio en la estructura taxonómica es relevante en cuanto a los beneficios o desventajas que pueda entregar microorganismo al hospedero. Esto podría permitir realizar comparaciones entre los diferentes sistemas. Lo que podrá concluir en el establecimiento de una microbiota saludable para los peces. Por otro lado, a medida que avanzan las técnicas de análisis de datos, podremos tener información más detallada sobre la toxemia a nivel de especie de los diferentes nichos. Esto enriquecerá el conocimiento acerca de la microbiota intestinal del salmón del Atlántico. Por ultimo, la utilización de herramientas de secuenciación de tercera generación es aplicables a todo el proceso productivo. Por lo que son útiles para la identificación de potenciales patógenos y podrían aplicarse para la identificación de microorganismos en los programas de vigilancia epidemiológica.

REFERENCIAS GENERALES

- Ahmad, A., Sheikh Abdullah, S. R., Hasan, H. A., Othman, A. R., & Ismail, N. (2021). Aquaculture industry: Supply and demand, best practices, effluent and its current issues and treatment technology. *J Environ Manage*, 287, 112271. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112271>
- Ahmed, N., & Thompson, S. (2019). The blue dimensions of aquaculture: A global synthesis. *Sci Total Environ*, 652, 851-861. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.163>
- Ahmed, N., & Turchini, G. M. (2021). Recirculating aquaculture systems (RAS): Environmental solution and climate change adaptation. *Journal of Cleaner Production*, 297, 126604. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126604>
- Anderson, C. D. (2006). A review of causal factors and control measures for bloat in farmed salmonids with a suggested mechanism for the development of the condition. *Journal of Fish Diseases*, 29(8), 445-453. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00738.x>
- Aro, L., Correa, K., Martínez, A., Idefonso, R., & Yáñez, J. M. (2014). Characterization of *Mycobacterium salmoniphilum* as causal agent of mycobacteriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., from a freshwater recirculation system. *J Fish Dis*, 37(4), 341-348. <https://doi.org/10.1111/jfd.12108>
- Asche, F., & Bjørndal, T. (2011). The Production Process in Aquaculture. In F. Asche & T. Bjørndal (Eds.), *The Economics of Salmon Aquaculture* (pp. 7-16). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119993384.ch2>
- Avendaño-Herrera, R., Collarte, C., Saldarriaga-Córdoba, M., & Irgang, R. (2020). New salmonid hosts for *Tenacibaculum* species: Expansion of tenacibaculosis in Chilean aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 43(9), 1077-1085. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfd.13213>
- Avendaño-Herrera, R., Irgang, R., Sandoval, C., Moreno-Lira, P., Houel, A., Duchaud, E., Poblete-Morales, M., Nicolas, P., & Ilardi, P. (2016). Isolation, Characterization and Virulence Potential of *Tenacibaculum dicentrarchi* in Salmonid Cultures in Chile. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(2), 121-126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tbed.12464>
- Azam, F., & Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 782-791. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1747>

- Bauer, J., Teitge, F., Neffe, L., Adamek, M., Jung, A., Pepler, C., Steinhagen, D., & Jung-Schroers, V. (2021). Impact of a reduced water salinity on the composition of *Vibrio* spp. in recirculating aquaculture systems for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and its possible risks for shrimp health and food safety. *J Fish Dis*, *44*(1), 89-105. <https://doi.org/10.1111/jfd.13270>
- Birrer, S. C., Dafforn, K. A., Sun, M. Y., Williams, R. B. H., Potts, J., Scanes, P., Kelaher, B. P., Simpson, S. L., Kjelleberg, S., Swarup, S., Steinberg, P., & Johnston, E. L. (2019). Using meta-omics of contaminated sediments to monitor changes in pathways relevant to climate regulation. *Environ Microbiol*, *21*(1), 389-401. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14470>
- Bjørge Thomassen, G. M., Krych, L., Knøchel, S., & Mehli, L. (2023). Bacterial community development and diversity during the first year of production in a new salmon processing plant. *Food Microbiology*, *109*, 104138. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104138>
- Bjørngen, H., Li, Y., Kortner, T. M., Krogdahl, Å., & Koppang, E. O. (2020). Anatomy, immunology, digestive physiology and microbiota of the salmonid intestine: Knowns and unknowns under the impact of an expanding industrialized production. *Fish & Shellfish Immunology*, *107*, 172-186. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.09.032>
- Blancheton, J. P., Attramadal, K. J. K., Michaud, L., d'Orbcastel, E. R., & Vadstein, O. (2013). Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication. *Aquacultural Engineering*, *53*, 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.11.009>
- Bœuf, G., & Payan, P. (2001). How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *130*(4), 411-423. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00268-X](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00268-X)
- Bouelet Ntsama, I. S., Tambe, B. A., Tsafack Takadong, J. J., Medoua Nama, G., & Kansci, G. (2018). Characteristics of fish farming practices and agrochemicals usage therein in four regions of Cameroon. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, *44*(2), 145-153. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.006>
- Chen, S., Luo, S., & Yan, C. (2021). Gut Microbiota Implications for Health and Welfare in Farm Animals: A Review. *Animals (Basel)*, *12*(1). <https://doi.org/10.3390/ani12010093>
- Curry, K. D., Wang, Q., Nute, M. G., Tyshaieva, A., Reeves, E., Soriano, S., Wu, Q., Graeber, E., Finzer, P., Mendling, W., Savidge, T., Villapol, S., Dilthey, A., & Treangen, T. J. (2022). Emu: species-level microbial community profiling of

- full-length 16S rRNA Oxford Nanopore sequencing data. *Nature Methods*, 19(7), 845-853. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01520-4>
- Cusco, A., Catozzi, C., Vines, J., Sanchez, A., & Francino, O. (2018). Microbiota profiling with long amplicons using Nanopore sequencing: full-length 16S rRNA gene and the 16S-ITS-23S of the *rrn* operon. *F1000Res*, 7, 1755. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16817.2>
- d'Orbcastel, E. R., Blancheton, J.-P., & Aubin, J. (2009). Towards environmentally sustainable aquaculture: Comparison between two trout farming systems using Life Cycle Assessment. *Aquacultural Engineering*, 40(3), 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2008.12.002>
- Dehler, C. E., Secombes, C. J., & Martin, S. A. M. (2017). Seawater transfer alters the intestinal microbiota profiles of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Scientific Reports*, 7(1), 13877. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13249-8>
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, 38(6), 685-688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Drønen, K., Roalkvam, I., Nilsen, H., Olsen, A. B., Dahle, H., & Wergeland, H. (2022). Presence and habitats of bacterial fish pathogen relatives in a marine salmon post-smolt RAS. *Aquaculture Reports*, 26, 101312. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101312>
- Du, X., Bayliss, S. C., Feil, E. J., Liu, Y., Wang, C., Zhang, G., Zhou, D., Wei, D., Tang, N., Leclercq, S. O., & Feng, J. (2019). Real time monitoring of *Aeromonas salmonicida* evolution in response to successive antibiotic therapies in a commercial fish farm. *Environ Microbiol*, 21(3), 1113-1123. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14531>
- Egan, S., Harder, T., Burke, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S., & Thomas, T. (2013). The seaweed holobiont: understanding seaweed-bacteria interactions. *FEMS Microbiol Rev*, 37(3), 462-476. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12011>
- Ellis, T., Berrill, I., Lines, J., Turnbull, J. F., & Knowles, T. G. (2012). Mortality and fish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), 189-199. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9547-3>
- Engering, A., Hogerwerf, L., & Slingenbergh, J. (2013). Pathogen-host-environment interplay and disease emergence. *Emerg Microbes Infect*, 2(2), e5. <https://doi.org/10.1038/emi.2013.5>
- Escalas, A., Hale, L., Voordeckers, J. W., Yang, Y., Firestone, M. K., Alvarez-Cohen, L., & Zhou, J. (2019). Microbial functional diversity: From concepts to

- applications. *Ecol Evol*, 9(20), 12000-12016.
<https://doi.org/10.1002/ece3.5670>
- FAO. (2022a). *Fisheries and Aquaculture Statistics. FishStatJ: Software for Fishery and Aquaculture Statistical Time Series*. In (Version v4.02.07) Fisheries and Aquaculture Division. Roma. <https://www.fao.org/fishery/en/topic/166235>
- FAO. (2022b). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Fossmark, R. O., Attramadal, K. J. K., Nordøy, K., Østerhus, S. W., & Vadstein, O. (2021). A comparison of two seawater adaptation strategies for Atlantic salmon post-smolt (*Salmo salar*) grown in recirculating aquaculture systems (RAS): Nitrification, water and gut microbiota, and performance of fish. *Aquaculture*, 532. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735973>
- Gonçalves, A. T., Collipal-Matamal, R., Valenzuela-Muñoz, V., Nuñez-Acuña, G., Valenzuela-Miranda, D., & Gallardo-Escárate, C. (2020). Nanopore sequencing of microbial communities reveals the potential role of sea lice as a reservoir for fish pathogens. *Sci Rep*, 10(1), 2895. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59747-0>
- Gonzalez-Gomez, M. P., Ovalle, L., Spinetto, C., Oyarzo, C., Oyarzun, R., Menanteau, M., Alvarez, D., Rivas, M., & Olmos, P. (2020). Experimental transmission of *Caligus rogercresseyi* between two different fish species. *Dis Aquat Organ*, 141, 127-138. <https://doi.org/10.3354/dao03513>
- Grove, A. (2022). Extracytoplasmic Function Sigma Factors Governing Production of the Primary Siderophores in Pathogenic Burkholderia Species [Mini Review]. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.851011>
- Hallström, E., Bergman, K., Mifflin, K., Parker, R., Tyedmers, P., Troell, M., & Ziegler, F. (2019). Combined climate and nutritional performance of seafoods. *Journal of Cleaner Production*, 230, 402-411. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.229>
- Heintz-Buschart, A., & Wilmes, P. (2018). Human Gut Microbiome: Function Matters. *Trends in Microbiology*, 26(7), 563-574. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.002>
- Highlander, S. (2013). Mock Community Analysis. In K. E. Nelson (Ed.), *Encyclopedia of Metagenomics* (pp. 1-7). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6418-1_54-1

- Hines, C. W., Fang, Y., Chan, V. K. S., Stiller, K. T., Brauner, C. J., & Richards, J. G. (2019). The effect of salinity and photoperiod on thermal tolerance of Atlantic and coho salmon reared from smolt to adult in recirculating aquaculture systems. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 230, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.12.008>
- Hjerde, E., Karlsen, C., Sorum, H., Parkhill, J., Willassen, N. P., & Thomson, N. R. (2015). Co-cultivation and transcriptome sequencing of two co-existing fish pathogens *Moritella viscosa* and *Aliivibrio wodanis*. *BMC Genomics*, 16, 447. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1669-z>
- Huyben, D., Roehe, B. K., Bekaert, M., Ruyter, B., & Glencross, B. (2020). Dietary Lipid:Protein Ratio and n-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids Alters the Gut Microbiome of Atlantic Salmon Under Hypoxic and Normoxic Conditions. *Front Microbiol*, 11, 589898. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.589898>
- Irgang, R., González-Luna, R., Gutiérrez, J., Poblete-Morales, M., Rojas, V., Tapia-Cammas, D., & Avendaño-Herrera, R. (2017). First identification and characterization of *Tenacibaculum dicentrarchi* isolated from Chilean red conger eel (*Genypterus chilensis*, Guichenot 1848). *Journal of Fish Diseases*, 40(12), 1915-1920. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfd.12643>
- Jennings, S., Stentiford, G. D., Leocadio, A. M., Jeffery, K. R., Metcalfe, J. D., Katsiadaki, I., Auchterlonie, N. A., Mangi, S. C., Pinnegar, J. K., Ellis, T., Peeler, E. J., Luisetti, T., Baker-Austin, C., Brown, M., Catchpole, T. L., Clyne, F. J., Dye, S. R., Edmonds, N. J., Hyder, K., Lee, J., Lees, D. N., Morgan, O. C., O'Brien, C. M., Oidtmann, B., Posen, P. E., Santos, A. R., Taylor, N. G. H., Turner, A. D., Townhill, B. L., & Verner-Jeffreys, D. W. (2016). Aquatic food security: insights into challenges and solutions from an analysis of interactions between fisheries, aquaculture, food safety, human health, fish and human welfare, economy and environment. *Fish and Fisheries*, 17(4), 893-938. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/faf.12152>
- Jin, S., Yan, X., Zhang, H., & Fan, W. (2015). Weight-length relationships and Fulton's condition factors of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) in the western and central Pacific Ocean. *PeerJ*, 3, e758. <https://doi.org/10.7717/peerj.758>
- Johansson, L. H., Timmerhaus, G., Afanasyev, S., Jorgensen, S. M., & Krasnov, A. (2016). Smoltification and seawater transfer of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is associated with systemic repression of the immune transcriptome. *Fish Shellfish Immunol*, 58, 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.026>
- Jonsson, B., & Jonsson, N. (2009). A review of the likely effects of climate change on anadromous Atlantic salmon *Salmo salar* and brown trout *Salmo trutta*, with particular reference to water temperature and flow. *Journal of Fish*

Biology, 75(10), 2381-2447. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02380.x>

Jung, A., & Chorlton, S. D. (2021). BugSeq 16S: NanoCLUST with Improved Consensus Sequence Classification. *bioRxiv*, 2021.2003.2016.434153. <https://doi.org/10.1101/2021.03.16.434153>

Karlsen, C., Vanberg, C., Mikkelsen, H., & Sorum, H. (2014). Co-infection of Atlantic salmon (*Salmo salar*), by *Moritella viscosa* and *Aliivibrio wodanis*, development of disease and host colonization. *Vet Microbiol*, 171(1-2), 112-121. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.011>

Kazmierczak, M. J., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2005). Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69(4), 527-543. <https://doi.org/10.1128/membr.69.4.527-543.2005>

Kobiyama, A., Ikeo, K., Reza, M. S., Rashid, J., Yamada, Y., Ikeda, Y., Ikeda, D., Mizusawa, N., Sato, S., Ogata, T., Jimbo, M., Kudo, T., Kaga, S., Watanabe, S., Naiki, K., Kaga, Y., Mineta, K., Bajic, V., Gojobori, T., & Watabe, S. (2018). Metagenome-based diversity analyses suggest a strong locality signal for bacterial communities associated with oyster aquaculture farms in Ofunato Bay. *Gene*, 665, 149-154. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.073>

Kotob, M. H., Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Abdelzaher, M., & El-Matbouli, M. (2016). The impact of co-infections on fish: a review. *Veterinary Research*, 47(1), 98. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0383-4>

Laroche, O., Pochon, X., Wood, S. A., & Keeley, N. (2021). Beyond taxonomy: Validating functional inference approaches in the context of fish-farm impact assessments. *Mol Ecol Resour*, 21(7), 2264-2277. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13426>

Lepe-López, M., Escobar-Dodero, J., Rubio, D., Alvarez, J., Zimin-Veselkoff, N., & Mardones, F. O. (2021). Epidemiological Factors Associated With *Caligus rogercresseyi* Infection, Abundance, and Spatial Distribution in Southern Chile. *Front Vet Sci*, 8, 595024. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.595024>

Li, Y., Bruni, L., Jaramillo-Torres, A., Gajardo, K., Kortner, T. M., & Kroghdahl, 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(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s42523-020-00071-3>

Llewellyn, M. S., McGinnity, P., Dionne, M., Letourneau, J., Thonier, F., Carvalho, G. R., Creer, S., & Derome, N. (2016). The biogeography of the atlantic

- salmon (*Salmo salar*) gut microbiome. *ISME J*, 10(5), 1280-1284. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.189>
- Løkka, G., & Koppang, E. O. (2016). Antigen sampling in the fish intestine. *Dev Comp Immunol*, 64, 138-149. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.014>
- Lorgen-Ritchie, M., Clarkson, M., Chalmers, L., Taylor, J. F., Migaud, H., & Martin, S. A. M. (2021). A Temporally Dynamic Gut Microbiome in Atlantic Salmon During Freshwater Recirculating Aquaculture System (RAS) Production and Post-seawater Transfer. *Frontiers in Marine Science*, 8, 711797. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.711797>
- Ma, J., Bruce, T. J., Jones, E. M., & Cain, K. D. (2019). A Review of Fish Vaccine Development Strategies: Conventional Methods and Modern Biotechnological Approaches. *Microorganisms*, 7(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110569>
- Madsen, S. S., Kiilerich, P., & Tipsmark, C. K. (2009). Multiplicity of expression of Na⁺,K⁺-ATPase {alpha}-subunit isoforms in the gill of Atlantic salmon (*Salmo salar*): cellular localisation and absolute quantification in response to salinity change. *J Exp Biol*, 212(Pt 1), 78-88. <https://doi.org/10.1242/jeb.024612>
- Makesh, M., Vinay, T. N., & Bedekar, M. K. (2022). Methods of Vaccine Delivery. In M. Makesh & K. V. Rajendran (Eds.), *Fish immune system and vaccines* (pp. 217-230). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-1268-9_10
- Mann, B. C., Bezuidenhout, J. J., Swanevelder, Z. H., & Grobler, A. F. (2021). MinION 16S datasets of a commercially available microbial community enables the evaluation of DNA extractions and data analyses. *Data Brief*, 36, 107036. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2021.107036>
- Marmen, S., Fadeev, E., Al Ashhab, A., Benet-Perelberg, A., Naor, A., Patil, H. J., Cytryn, E., Viner-Mozzini, Y., Sukenik, A., Lalzar, M., & Sher, D. (2021). Seasonal Dynamics Are the Major Driver of Microbial Diversity and Composition in Intensive Freshwater Aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.679743>
- Matsuo, Y., Komiya, S., Yasumizu, Y., Yasuoka, Y., Mizushima, K., Takagi, T., Kryukov, K., Fukuda, A., Morimoto, Y., Naito, Y., Okada, H., Bono, H., Nakagawa, S., & Hirota, K. (2021). Full-length 16S rRNA gene amplicon analysis of human gut microbiota using MinION nanopore sequencing confers species-level resolution. *BMC Microbiol*, 21(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02094-5>
- Milligan-Myhre, K., Small, C. M., Mittge, E. K., Agarwal, M., Currey, M., Cresko, W. A., & Guillemin, K. (2016). Innate immune responses to gut microbiota differ

- between oceanic and freshwater threespine stickleback populations. *Dis Model Mech*, 9(2), 187-198. <https://doi.org/10.1242/dmm.021881>
- Minich, J. J., Petrus, S., Michael, J. D., Michael, T. P., Knight, R., & Allen, E. E. (2020). Temporal, Environmental, and Biological Drivers of the Mucosal Microbiome in a Wild Marine Fish, *Scomber japonicus*. *mSphere*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00401-20>
- Miranda, C. D., Rojas, R., Contreras-Lynch, S., & Vega, A. (2021). Evaluation of the correlation between minimum inhibitory concentrations (MIC) and disk diffusion data of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from outbreaks occurred in Chilean salmonid farms. *Aquaculture*, 530, 735811. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735811>
- Moschos, S., Kormas, K. A., & Karayanni, H. (2022). Prokaryotic diversity in marine and freshwater recirculating aquaculture systems. *Reviews in Aquaculture*. <https://doi.org/10.1111/raq.12677>
- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Buschmann, A. H., Bush, S. R., Cao, L., Klinger, D. H., Little, D. C., Lubchenco, J., Shumway, S. E., & Troell, M. (2021). A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, 591(7851), 551-563. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-6>
- Nisembaum, L. G., Martin, P., Lecomte, F., & Falcon, J. (2021). Melatonin and osmoregulation in fish: A focus on Atlantic salmon *Salmo salar* smoltification. *J Neuroendocrinol*, 33(3), e12955. <https://doi.org/10.1111/jne.12955>
- Oelckers, K., Vike, S., Duesund, H., Gonzalez, J., Wadsworth, S., & Nylund, A. (2014). *Caligus rogercresseyi* as a potential vector for transmission of Infectious Salmon Anaemia (ISA) virus in Chile. *Aquaculture*, 420-421, 126-132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.016>
- Ofek, T., Lalzar, M., Izhaki, I., & Halpern, M. (2022). Intestine and spleen microbiota composition in healthy and diseased tilapia. *Anim Microbiome*, 4(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00201-z>
- Oliveira, V. H. S., Dean, K. R., Qviller, L., Kirkeby, C., & Bang Jensen, B. (2021). Factors associated with baseline mortality in Norwegian Atlantic salmon farming. *Sci Rep*, 11(1), 14702. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93874-6>
- Ovegård, M., Berndt, K., & Lunneryd, S.-G. (2012). Condition indices of Atlantic cod (*Gadus morhua*) biased by capturing method. *ICES Journal of Marine Science*, 69(10), 1781-1788. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fss145>

- Pattaroni, C., Kieser, S., & Marsland, B. (2018). Virulence Factor Database for 16S metagenomics. *Mendeley Data*, V1. <https://doi.org/10.17632/rvxtbtscw.1>
- Robertson, L. S., & McCormick, S. D. (2012). Transcriptional profiling of the parr-smolt transformation in Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 7(4), 351-360. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbd.2012.07.003>
- Rodriguez-Perez, H., Ciuffreda, L., & Flores, C. (2021). NanoCLUST: a species-level analysis of 16S rRNA nanopore sequencing data. *Bioinformatics*, 37(11), 1600-1601. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa900>
- Rozas, M., Brillet, F., Callewaert, C., & Paetzold, B. (2021). MinION Nanopore Sequencing of Skin Microbiome 16S and 16S-23S rRNA Gene Amplicons. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 806476. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.806476>
- Rud, I., Kolarevic, J., Holan, A. B., Berget, I., Calabrese, S., & Terjesen, B. F. (2017). Deep-sequencing of the bacterial microbiota in commercial-scale recirculating and semi-closed aquaculture systems for Atlantic salmon post-smolt production. *Aquacultural Engineering*, 78, 50-62. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2016.10.003>
- SalmonChile. (2021). *El ciclo productivo del salmón, una cadena de valor completa*. Retrieved September 2022 from <https://www.salmonchile.cl/blog/el-ciclo-productivo-del-salmon-una-cadena-de-valor-completa/>
- Santurtun, E., Broom, D. M., & Phillips, C. J. C. (2018). A review of factors affecting the welfare of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Animal Welfare*, 27(3), 193-204. <https://doi.org/10.7120/09627286.27.3.193>
- Schmidt, V., Amaral-Zettler, L., Davidson, J., Summerfelt, S., & Good, C. (2016). Influence of Fishmeal-Free Diets on Microbial Communities in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Recirculation Aquaculture Systems. *Appl Environ Microbiol*, 82(15), 4470-4481. <https://doi.org/10.1128/AEM.00902-16>
- Schmidt, V. T., Smith, K. F., Melvin, D. W., & Amaral-Zettler, L. A. (2015). Community assembly of a euryhaline fish microbiome during salinity acclimation. *Molecular Ecology*, 24(10), 2537-2550. <https://doi.org/10.1111/mec.13177>
- Schreier, H. J., Mirzoyan, N., & Saito, K. (2010). Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems. *Curr Opin Biotechnol*, 21(3), 318-325. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.011>

- Segner, H., Reisser, S., Ruane, N., Rösch, R., Steinhagen, D., & Vehanen, T. (2019). Welfare of fishes in aquaculture. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular NO. 1189. Budapest, FAO.*
- Sernapesca. (2018). Informe sanitario con informacion sanitaria de agua dulce y mar año 2017. *Departamento de Salud Animal. Subdirección de Acuicultura. Gobierno de Chile.* <http://www.sernapesca.cl/informes/resultados-gestion>.
- Sernapesca. (2020). Boletín Ambiental Diciembre 2020: Evaluación de los informes ambientales de los centros de cultivo – Regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes. *Departamento de Salud Animal. Subdirección de Acuicultura. Gobierno de Chile.* <http://www.sernapesca.cl/informes/resultados-gestion>
- Sernapesca. (2021a). Cosecha de centros de acuicultura año 2021. Cosechas de centros de acuicultura por especie y región. *Departamento de Salud Animal. Subdirección de Acuicultura. Gobierno de Chile.* <http://www.sernapesca.cl/informacion-utilidad/anuarios-estadisticos-de-pesca-y-acuicultura>
- Sernapesca. (2021b). Informe sanitario con informacion sanitaria de agua dulce y mar año 2021. *Departamento de Salud Animal. Subdirección de Acuicultura. Gobierno de Chile.* <http://www.sernapesca.cl/informes/resultados-gestion>.
- Sernapesca. (2021c). Informe Sobre Uso De Antimicrobianos En La Salmonicultura Nacional Año 2020. *Departamento de Salud Animal. Subdirección de Acuicultura. Gobierno de Chile.* <http://www.sernapesca.cl/informes/resultados-gestion>.
- Stentiford, G. D., Sritunyalucksana, K., Flegel, T. W., Williams, B. A. P., Withyachumnarnkul, B., Itsathitphaisarn, O., & Bass, D. (2017). New Paradigms to Help Solve the Global Aquaculture Disease Crisis. *PLOS Pathogens*, 13(2), e1006160. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006160>
- Strand, J. E. T., Hazlerigg, D., & Jørgensen, E. H. (2018). Photoperiod revisited: is there a critical day length for triggering a complete parr–smolt transformation in Atlantic salmon *Salmo salar*? *Journal of Fish Biology*, 93(3), 440-448. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfb.13760>
- Sundh, H., Nilsen, T. O., Lindstrom, J., Hasselberg-Frank, L., Stefansson, S. O., McCormick, S. D., & Sundell, K. (2014). Development of intestinal ion-transporting mechanisms during smoltification and seawater acclimation in Atlantic salmon *Salmo salar*. *J Fish Biol*, 85(4), 1227-1252. <https://doi.org/10.1111/jfb.12531>

- Thlusty, M. F. (2020). Animal health: the foundation for aquaculture sustainability. In *Aquaculture Health Management* (pp. 1-15). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813359-0.00001-4>
- Todor, H., Osadnik, H., Campbell, E. A., Myers, K. S., Li, H., Donohue, T. J., & Gross, C. A. (2020). Rewiring the specificity of extracytoplasmic function sigma factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *117*(52), 33496-33506. <https://doi.org/10.1073/pnas.2020204117>
- Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E., & Spector, T. D. (2018). Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*, *361*, k2179. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>
- Valenzuela-Miranda, D., Gonçalves, A. T., Valenzuela-Muñoz, V., Nuñez-Acuña, G., Liachko, I., Nelson, B., & Gallardo-Escarate, C. (2022). Proximity ligation strategy for the genomic reconstruction of microbial communities associated with the ectoparasite *Caligus rogercresseyi*. *Sci Rep*, *12*(1), 783. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04485-0>
- Valenzuela-Muñoz, V., Váldez, J. A., & Gallardo-Escárate, C. (2021). Transcriptome Profiling of Long Non-coding RNAs During the Atlantic Salmon Smoltification Process. *Marine Biotechnology*, *23*(2), 308-320. <https://doi.org/10.1007/s10126-021-10024-9>
- Wang, J., Jaramillo-Torres, A., Li, Y., Kortner, T. M., Gajardo, K., Brevik, O. J., Jakobsen, J. V., & Krogdahl, A. (2021). Microbiota in intestinal digesta of Atlantic salmon (*Salmo salar*), observed from late freshwater stage until one year in seawater, and effects of functional ingredients: a case study from a commercial sized research site in the Arctic region. *Animal Microbiome*, *3*(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00075-7>
- Wise, A. L., LaFrentz, B. R., Kelly, A. M., Khoo, L. H., Xu, T., Liles, M. R., & Bruce, T. J. (2021). A Review of Bacterial Co-Infections in Farmed Catfish: Components, Diagnostics, and Treatment Directions. *Animals*, *11*(11), 3240. <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/11/3240>
- Yogev, U., & Gross, A. (2019). Reducing environmental impact of recirculating aquaculture systems by introducing a novel microaerophilic assimilation reactor: Modeling and proof of concept. *Journal of Cleaner Production*, *226*, 1042-1050. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.003>