

Optimización del cultivo de paralarvas de *Octopus vulgaris* a través del estudio de la microbiota



Trabajo de Fin de Master

Joel Díaz del Rosario

Tutora: Dra. Deiene Rodríguez Barreto

Cotutor: Dr. Jesús Arrieta López

Master en Biomedicina

2022/2022

Dra Deiene Rodríguez Barreto, componente del Grupo de Investigación de Cultivos Marinos y Dr Jesús María Arrieta López de Uralde adscritos a la Titulación Máster en Biomedicina por la ULL

CERTIFICO /CERTIFICAN

- Que el Trabajo Fin de Máster (TFM) titulado: Optimización del cultivo de paralarvas de Octopus vulgaris a través del estudio de la microbiota, ha sido realizado bajo mi/nuestra supervisión por D^a/D Joel Diaz del Rosario, matriculada/o en el Máster en Biomedicina, durante el curso académico 2021-2022.
- Que una vez revisada la memoria final del TFM, doy/damos mi/nuestro consentimiento para ser presentado a la evaluación (lectura y defensa) por el Tribunal designado por la Comisión Académica de la Titulación.
- Que se ha indicado expresamente, a través del mecanismo de entrega de la memoria TFM por sede electrónica ULL, el deseo de hacer público o no los resultados del TFM.

Para que conste, se firma el presente certificado en La Laguna a 6 de septiembre de 2022

**RODRIGUEZ
BARRERO
DEIENE -
78631239N**

Firmado digitalmente
por RODRIGUEZ
BARRERO DEIENE -
78631239N
Fecha: 2022.09.06
22:04:01 +01'00'

**ARRIETA LOPEZ
DE URALDE
JESUS MARIA -
16294593J**

Digitally signed by
ARRIETA LOPEZ DE
URALDE JESUS MARIA -
16294593J
Date: 2022.09.06 21:24:23
+01'00'

Resumen

El pulpo común (*Octopus vulgaris*) es una especie de molusco cefalópodo bentónico perteneciente a la familia Octopodidae con una amplia distribución mundial que ha despertado un gran interés en el ámbito de la acuicultura debido a su rápido crecimiento y corto periodo de vida, pero su producción a gran escala ha supuesto un desafío a causa de la alta mortalidad presente en las primeras etapas de vida. La principal causa de mortalidad parece estar definida por la ausencia de una dieta adecuada que suministre los nutrientes necesarios para su correcto desarrollo y por unas condiciones zootécnicas desfavorables. En el presente estudio se pone de manifiesto la importancia de la microbiota y como ésta puede tener un papel importante en el crecimiento y supervivencia de las paralarvas de *O. vulgaris* en sus primeras etapas de vida. Para ello se cultivaron paralarvas alimentadas con diferentes presas (*Artemia salina* y zoeas de *Grapsus adscensionis*) y periodos de tiempo, y se tomaron muestras para el estudio de crecimiento, supervivencia y el análisis de su microbiota. Los experimentos realizados mostraron que una dieta en “Co-feeding” durante 14 días, aumenta el crecimiento y la supervivencia de las mismas debido a un mejor aporte nutricional y al efecto amortiguador que las zoeas de *G. adscensionis* parece tener sobre la pérdida de diversidad microbiana en el microbioma de las paralarvas, gracias a la mayor diversidad microbiana que aporta esta presa.

Palabras claves: *Octopus vulgaris*; Paralarva; Presa alternativa; Crecimiento y supervivencia; Microbioma.

Abstract

Octopus vulgaris is a benthic cephalopod mollusk belonging to the Octopodidae family with a worldwide distribution and great interest in the field of aquaculture due to its rapid growth and short lifespan, but its production on a large scale has been a challenge due to the high mortality present in the first life stages. The main cause of mortality seems to be defined by the absence of an adequate diet that supplies the required nutrients for its correct development and by unfavourable zootechnical conditions. In the present study, we manifested the importance of the microbiota and how it can play an important role in the growth and survival in the early life stages of *O. vulgaris* paralarvae. To this aim, paralarvae were fed with different preys (*Artemia salina* and *Grapsus adscensionis*) and during different time span. Samples were taken for the study of growth, survival and the analysis of their microbiota. The experiments carried out showed that a "Co-feeding" diet for 14 days increases their growth and survival due to a better nutritional contribution and a buffering effect on paralarvae microbial diversity lost produced by the greater microbial diversity provided by the *G. adscensionis* zoeas.

Keywords: *Octopus vulgaris*; Paralarvae; Alternative prey; Growth and survival; Microbiome.

Índice

Introducción	6
El pulpo común: importancia de las presas vivas sobre el cultivo larvario.	6
Microbiota: Importancia de caracterizar las comunidades microbianas para avanzar en el cultivo del pulpo.	7
Objetivos	11
Material y métodos	12
Diseño experimental	12
Experimento 1	12
Experimento 2	13
Experimentos preliminares de enriquecimiento de presas vivas	15
Análisis de microbiota	16
Extracción de ADN	16
Purificación de ADN con AMPure XP beads	16
Amplificación de la región V1-V3	17
Limpieza e Indexado	18
Cuantificación, normalización y “pooling”	19
Análisis de los datos y estudio estadístico.....	19
Secuenciación y análisis de las secuencias.....	20
Resultados	22
Efecto de las presas en el crecimiento y supervivencia de las paralarvas	22
Estudio del microbioma de presas y paralarvas	24
Efecto del enriquecimiento de <i>Artemia salina</i> sobre la comunidad microbiana de la presa... ..	27
Efecto del enriquecimiento/engorde de <i>Grapsus adscensionis</i> sobre la comunidad microbiana de la presa.....	27
Resultados del experimento en 1L	29
Resultados del experimento en 100L	29
Discusión	33
Conclusiones	37
Bibliografía	38

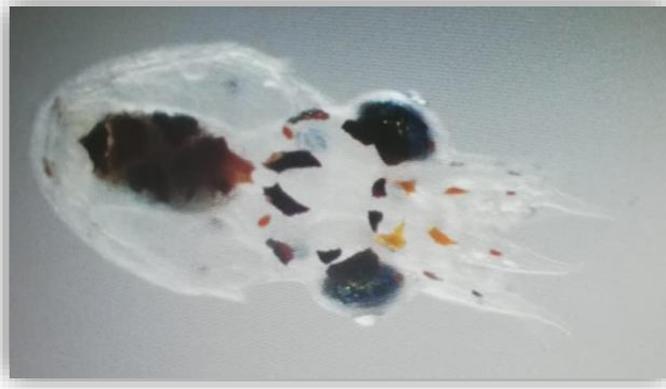
Introducción

El pulpo común: importancia de las presas vivas sobre el cultivo larvario.

El pulpo común (*Octopus vulgaris*) es una especie de molusco cefalópodo bentónico perteneciente a la familia Octopodidae que contiene unas 200 especies (Norman y Hochberg, 2005) con una amplia distribución mundial. La estrategia de proliferación que realizan consiste en la producción de un gran número de huevos de pequeño tamaño. De los huevos nacerán crías con una morfología poco desarrollada, y con una ocupación de nicho ecológico diferente al adulto (Villanueva y Norman, 2008).

Las diferencias entre las primeras fases de vida y la fase adulta, han llevado a definir a las crías como “paralarvas” (Young, 1988) (Figura 1).

Figura 1. Paralarvae de *Octopus vulgaris*.



Fuente: Joel Díaz del Rosario

En la actualidad esta especie ha despertado un gran interés en el ámbito de la acuicultura debido a su rápido crecimiento y corto periodo de vida (Iglesias et al., 2014), sin embargo, su producción a gran escala ha supuesto un desafío a causa de la alta mortalidad presente en las primeras etapas de vida. La principal causa de mortalidad parece estar definida por la ausencia de una dieta adecuada que suministre los nutrientes necesarios para su correcto desarrollo y por unas condiciones zootécnicas desfavorables (Iglesias et al., 2014; Reis et al., 2021). Entre las dietas usadas por la industria, la única viable en grandes cantidades es *Artemia* spp. , sin embargo, alimentar a paralarvas de pulpo únicamente con esta presa, supone un bajo ratio de crecimiento y supervivencia en las paralarvas (Garrido et al., 2018; Iglesias et al., 2014; Navarro et al., 2014). Para salvar estas deficiencias producidas por *Artemia* spp. se ha llevado a cabo “co-feeding”, suministrando dietas

inertes (de Moraes Lenz et al., 2019; Navarro y Villanueva, 2003) u otras presas vivas, principalmente zoeas de crustáceos decápodos como *Grapsus adscensionis* (D. B. Reis et al., 2015), *Pagurus prideaux* (Villanueva, 1994) o *Maja bachydactyla* (Iglesias et al., 2014). Mientras que las dietas inertes son ignoradas (Seixas et al., 2010) o muestran poca ingesta (Navarro y Villanueva, 2003), las zoeas de decápodos como *G. adscensionis* (Reis et al., 2015; Roo et al., 2017) son aceptadas y muestran ratios de crecimiento mayores que cuando son alimentadas con *Artemia* spp. como única presa.

En estudios anteriores, se usaron zoeas de crustáceos decápodos en “co-feeding” con *Artemia* spp. (J. Iglesias et al., 2014; Roo et al., 2017; Villanueva, 1994) dada la imposibilidad de utilizar zoeas como presa única, debido a que estas especies alternativas (ej. *M. bachydactyla*) poseen un alto valor económico y conllevan gran complejidad logística. La especie *G. adscensionis* no posee valor comercial, tiene facilidad en la reproducción en cautividad y es muy abundante en las costas (Shcherbakova et al., 2011), si bien también existen dificultades logísticas que la limitan a su uso en “co-feeding”. Como se detalla con anterioridad, se ha evaluado el valor nutricional de esta presa alternativa (*G. adscensionis*) y su efecto sobre el crecimiento y supervivencia de las paralarvas (Iglesias et al., 2004; Reis et al., 2015; Roo et al., 2017; Villanueva, 1994), si bien existen otros parámetros de relevancia para el cultivo, como puede ser la microbiota, que aún no han sido estudiados en profundidad.

Microbiota: Importancia de caracterizar las comunidades microbianas para avanzar en el cultivo del pulpo.

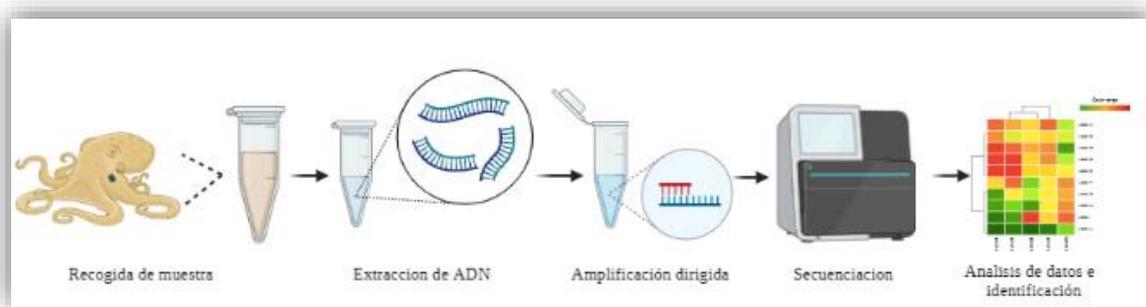
La microbiota de organismos marinos es altamente especie específica, y se puede ver influenciada por numerosos factores ambientales e intrínsecos que van a repercutir en la salud y homeostasis del hospedador (Apprill, 2017; Merrifield y Rodiles, 2015). Las comunidades microbianas tienen una gran relevancia funcional, y están directa o indirectamente involucradas en diferentes procesos fisiológicos claves para el correcto desarrollo del organismo; ej. digestión de nutrientes (Ray et al., 2012), mantenimiento de la inmunidad de las mucosas y prevención de la colonización de patógenos (Legrand et al., 2018), modulación del comportamiento y capacidad adaptiva (Ezenwa et al., 2012), etc. Factores ambientales como la temperatura del agua y salinidad y/o las condiciones de cultivo han mostrado tener influencia sobre la microbiota intestinal peces (Minich et

al., 2021). Si bien, la dieta ha demostrado ser uno de los mayores moduladores de la flora intestinal de organismos acuáticos (Roura et al., 2017; Sera, 1972; Wilkes Walburn et al., 2019)

Hasta la actualidad, se han realizado numerosos estudios con métodos cultivo-dependientes de microorganismos asociados a especies marinas (Forney et al., 2004). Sin embargo, esta aproximación es muy limitada debido a que la mayoría de los microorganismos presentes no se pueden cultivar *in vitro* (Fjellheim et al., 2007) o requieren de un esfuerzo de cultivo muy superior al que es posible o viable (Abdelfattah et al., 2018). Para superar esta limitación se han desarrollado métodos independientes de cultivos, como la detección y secuenciación del gen de la subunidad pequeña del ribosoma 16S (Hebert et al., 2003; Janda y Abbott, 2007; Johnson et al., 2019). El desarrollo de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento ha permitido que sea posible secuenciar de forma simultánea múltiples especies de una misma comunidad, y múltiples muestras de forma simultánea. Esta técnica, denominada “Metabarcoding”, si bien no está libre de sesgos y limitaciones (Forney et al., 2004), permite la caracterización de la biodiversidad microbiana de una muestra (composición taxonómica y densidad relativa) con una alta fiabilidad y rapidez, y de una manera económicamente rentable. Además, al permitir analizar numerosas muestras a la vez, nos permite diseñar esquemas de muestreo estadísticamente válidos para testar nuestras hipótesis, ayudándonos a comprender mejor cómo cambia la estructura de una comunidad dada en respuesta a diversas perturbaciones, lo cual no sería posible de otra manera (Forney et al., 2004).

El flujo de trabajo para caracterizar la composición de una comunidad microbiana utilizando “Metabarcoding” implica cinco pasos principales: 1) muestreo; 2) extracción de ADN; 3) amplificación dirigida; 4) secuenciación; 5) análisis de datos (Figura 2).

Figura 2. Representación gráfica de los pasos implicados en el “Metabarcoding”.



Fuente: Joel Díaz del Rosario

El microbioma en los moluscos juega un papel importante en muchos aspectos de la biología del huésped, incluida la nutrición y la digestión, el metabolismo, la función inmunológica, la reproducción y el desarrollo, el comportamiento, las interacciones depredador-presa y la supervivencia en condiciones abióticas desafiantes (Chalifour y Li, 2021). Investigaciones sobre el rol de los microorganismos en las relaciones mutualistas / simbióticas en cefalópodos, han demostrado ser esclarecedoras, demostrando la importancia de estas en el correcto desarrollo del animal, participando en funciones como la protección frente a organismos patógenos (Iehata et al., 2016), la fabricación de enzimas que ayudan a la digestión (Iehata et al., 2015), o con funciones simbióticas en la producción de bioluminiscencia (Koch et al., 2014), entre otras. Diversos estudios han caracterizado las comunidades microbianas de diversas especies de cefalópodos, principalmente cefalópodos coloideos de interés para el consumo humano, que incluye especies de pulpo (Lee et al., 2017; Roura et al., 2017), sepias (*Sepia officinalis*; (Lutz et al., 2019); *Sepia esculenta*; (Kang et al., 2022)) y calamares (*Sthenoteuthis oualaniensis*, *Sthenoteuthis pteropus*, *Dosidicus gigas*, *Todarodes sagittatus* y *Ommastrephes spp.*; (Fernández-Álvarez et al., 2018); *Loliolus beka*, *Uroteuthis edulis* y *Todarodes pacificus*; (Kang et al., 2022)). La mayoría de estos estudios se centra en la microbiota intestinal de las especies citadas, y de sus resultados cabe destacar: que cada especie presenta un perfil (comunidad microbiana) distintivo, en el cual *Photobacterium* (Proteobacteria) y *Mycoplasma* (Firmicutes) constituyen los taxones dominantes en todas ellas, y que los cefalópodos presentan una comunidad microbiana intestinal disímil de la observada en otros grupos de moluscos o peces marinos (Kang et al., 2022; Sanz González, 2020). Entre las investigaciones que se han realizado sobre la diversidad microbiana dentro del género *Octopus*, encontramos diversos estudios en la especie *Octopus Maya* (de la Cruz-Leyva et al., 2011; Iehata et al., 2015, 2016) que emplean técnicas anteriores al desarrollo de técnicas de secuenciación masiva, y 3 estudios que emplean “Metabarcoding” y secuenciación masiva, dos de ellos en *Octopus variabilis* (Kang et al., 2022; Lee et al., 2017) y otros 2 en el pulpo común (*Octopus vulgaris*) (Kang et al., 2022; Roura et al., 2017). Roura et al., 2017, estudió la composición intestinal de paralarvas salvajes y cultivadas de pulpo común, y describe una importante pérdida de diversidad en paralarvas cultivadas con respecto a sus congéneres silvestres, y una notable similitud de la comunidad microbiana de estas últimas con las especies de zooplancton estudiadas, al menos en áreas costeras. En este mismo estudio se puede observar una pérdida considerable de diversidad de las paralarvas cultivadas (las cuales habían sido

alimentadas con *Artemia*) a lo largo de su desarrollo y que fue evidente a los 5 días de cultivo. Las especies de *Artemia*, se caracterizan por presentar una baja diversidad microbiana, estando dominadas por especies halófilas de los géneros *Halomonas* y *Salinivibrio* (Tkavc et al., 2011), taxones que no forman parte constitutiva de la comunidad microbiana central de *Octopus vulgaris*. Todo ello, sugiere que la utilización de monocultivos de *Artemia* spp. como presa viva en el cultivo de paralarvas de pulpo, además de afectar al crecimiento y supervivencia por proporcionar una calidad nutricional inadecuada (Garrido et al., 2018; José Iglesias et al., 2014; Juan Carlos Navarro et al., 2014; Diana B. Reis et al., 2021), puede afectar a la aptitud y potencial de crecimiento de las paralarvas al ocasionar una disbiosis (desbalance del equilibrio microbiano) que podría afectar negativamente a las capacidades metabólicas de las paralarvas, y actuar como vector o como facilitador de la aparición de patógenos oportunistas. La suplementación o “co-feeding” con zoeas de crustáceos decápodos, además de aportar un valor nutricional adicional (Garrido et al., 2018), podrían contribuir a diversificar la comunidad microbiana de las paralarvas cultivadas. Al tratarse de presas que forman parte de la dieta del pulpo en su medio natural (Roura et al., 2012), y presentar una microbiota diversa (Lu et al., 2022) y con una mayor similitud con la flora intestinal de las paralarvas de pulpo (Roura et al., 2017), podrían llegar a contrarrestar el efecto disruptivo y el desequilibrio sobre la microbiota ocasionado por la *Artemia*.

De todo lo expuesto se desprende la necesidad de un estudio comparativo dónde se establezca el efecto de ambas presas vivas (*Artemia* spp.) y zoeas de crustáceo, tanto en monocultivo, como en “co-feeding”, sobre la microbiota de paralarvas de pulpo, y su correlación con parámetros de crecimiento y supervivencia, que amplíen el conocimiento en este campo y abran el camino a mejorar la acuicultura de esta especie.

Objetivos

El objetivo general de este estudio es mejorar el conocimiento actual sobre el efecto de la dieta suministrada a las paralarvas de pulpo común (*Octopus vulgaris*) sobre la microbiota durante las primeras fases de vida, empleando las presas *Artemia salina* y *Grapsus adscensionis*. Este objetivo general se puede desglosar en los siguientes objetivos específicos.

- Determinar el efecto de la alimentación con *Artemia salina* y *Grapsus adscensionis* sobre el crecimiento y supervivencia de las paralarvas de *O. vulgaris*.
- Evaluar el efecto de la alimentación con *Artemia salina* y *Grapsus adscensionis* sobre las comunidades microbianas de paralarvas cultivadas de *O. vulgaris*, y establecer su relación con parámetros de crecimiento y supervivencia.

Material y métodos

Diseño experimental

Para evaluar el efecto de la alimentación con *Artemia salina* y *G. adscensionis* sobre las comunidades microbianas en el cultivo de paralarvas de *O. vulgaris* y su relación con parámetros de crecimiento y supervivencia, se realizaron dos experimentos. Ambos experimentos fueron realizados en el IEO (Instituto Español de Oceanografía - Tenerife, Islas Canarias, España).

En ambos experimentos, las paralarvas utilizadas nacieron el día de inicio del experimento en cuestión, y provenían de una misma puesta de huevos. Para asegurar que se trataba de paralarvas de 0 días (menos de 24 horas de vida), las paralarvas fueron sifonadas en el día de inicio del experimento, contadas manualmente y transferidas a los tanques donde se realizaron los experimentos cuyas características se detallan bajo estas líneas (Figura 4).

Experimento 1

El experimento 1 se llevó a cabo para determinar los cambios que ocurren en la microbiota de las paralarvas de pulpo durante los estadios más iniciales cuando éstas son alimentadas con *A. salina* y *G. adscensionis* tanto en monocultivo, como en “co-feeding”. Dicho experimento tuvo una duración de 5 días (desde el 17 de marzo de 2022, hasta el 21 de marzo de 2022).

En este experimento un total de 180 paralarvas de *O. vulgaris* de menos de 24 h de vida fueron distribuidas en 12 tanques, haciendo un total de 15 paralarvas por tanque. Las

Tabla 1. Concentración de las dietas suministradas por día. *salina*, (2) zoeas de *G. adscensionis* y (3) “co-feeding” de *A. salina* con zoeas de *G. adscensionis*. El estudio se realizó por cuadruplicado, dónde los 3 tratamientos dietarios se distribuyeron aleatoriamente entre los 12 tanques. Se utilizaron vasos de plástico de 1 L de capacidad con forma troncocónica de color negro y con una renovación de agua salada filtrada a 24 ml/min aproximadamente comprendiendo un sistema de 12 tanques (Figura 3 A). Se dispuso aireación desde un lateral para proveer el correcto suministro de oxígeno y un sistema de iluminación con 300-400 lx de día (12h) con led blanco y 2 lx de noche (12h) con led verde. Cada día se dividió en 6 tomas (9:30, 11, 13, 15, 17 y 19 h) en las que se suministraba la dieta correspondiente a cada tanque (Tabla 1).

Dieta suministrada	Concentraciones totales por día
<i>Artemia</i>	500 art. en 60 ml (10ml por toma)
“Co-feeding”	250 art. y 250 zoeas en 120 ml (10ml por toma)
Zoeas de <i>G. adscensionis</i>	200-500 zoeas en 60 según disponibilidad (10ml por toma)

Tras los 5 días, el experimento concluyó con la toma de las muestras y el trasvase a un vial de propileno estéril de 1,5 ml, que se transfirió de forma inmediata a -80 °C, temperatura en la que se almacenó hasta su posterior análisis.

Experimento 2

El experimento 2 se llevó a cabo para determinar el efecto de “co-feeding” *A. salina* y *G. adscensionis* sobre la microbiota, crecimiento y supervivencia de paralarvas de *Octopus*

Tabla 2. Concentración de las dietas suministradas por día. Con menos de 24 h de vida fueron sometidas a tres regímenes dietarios diferentes: (1) Alimentación durante 14 días con *A. salina*, (2) Alimentación con zoeas de *G. adscensionis* y *A. salina* en “co-feeding” durante 7 días y a continuación alimentación sólo con *A. salina* hasta cierre de experimento, y (3) Alimentación con zoeas de *G. adscensionis* y *A. salina* en “co-feeding” durante 14 días. El estudio se realizó por cuadruplicado, lo que se resume en 12 tanques con 500 paralarvas / tanque, con una concentración aproximada de 5 paralarvas / L. Se añadió fitoplancton de manera regular cada día para reducir el estrés producido por la alta luminosidad y mejorar el bienestar animal. El experimento tuvo una duración total de 15 días (desde el día 17 de marzo de 2022, hasta el 31 de marzo de 2022). Para este experimento se emplearon tanques de fibra de vidrio con forma troncocónica de color negro, de 100 L de capacidad y con una renovación de agua salada filtrada de 90 ml/min, aproximadamente, formando también un sistema de 12 tanques (Figura 3 B). Se dispuso aireación desde un lateral para proveer el correcto suministro de oxígeno y un sistema de iluminación con 300-400 lx de día (12h) con led blanco y 2 lx de noche (12h) con led verde. Cada día se dividió en 6 tomas (9:30, 11, 13, 15, 17 y 19 h) en las que se suministraba la dieta correspondiente. Las concentraciones de *G. adscensionis* suministradas en las dietas que lo requerían variaron según la disponibilidad de esta presa (Tabla 2).

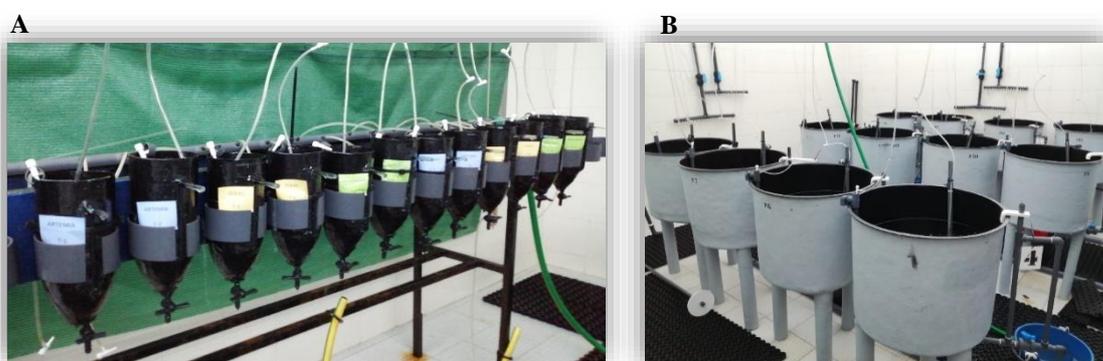
El cierre del experimento a los 15 días concluyó con la toma de muestras. Para el análisis de la microbiota se transvasaron 20 paralarvas a un vial de propileno estéril de 1,5 ml, se transfirieron de forma inmediata a -80 °C, y se almacenaron a dicha temperatura hasta su posterior análisis.

Dieta suministrada	Concentraciones totales por día
<i>Artemia</i>	20000-30000 art en 300 ml (50 ml por toma)
“Co-feeding” con zoeas de <i>G. adscensionis</i>	20000-30000 art 650-3600 en 600 ml (50 ml por toma). Según disponibilidad

Para determinar tasas de crecimiento se determinó el peso seco inicial y final de las paralarvas a 7 y 15 días. Se tomaron aleatoriamente 5 paralarvas por tanque a los 7 y 15 días. El peso seco se determinó por gravimetría de forma individual. Las paralarvas se colocaron individualmente en pocillos estériles y se mantuvieron en una estufa a 100 °C durante 24 h, transcurrido este periodo de tiempo, se transfirió a un deshumidificador para evitar la hidratación mientras se atemperan, y posteriormente se pesó en una micro balanza. La tasa de crecimiento se estableció en base al cálculo del IGR \bar{x} con la siguiente formula.
$$\frac{(\text{LN del peso } \bar{x} \text{ final} - \text{LN del peso } \bar{x} \text{ en 0 días})}{\text{N}^\circ \text{ de días}} \times 100.$$

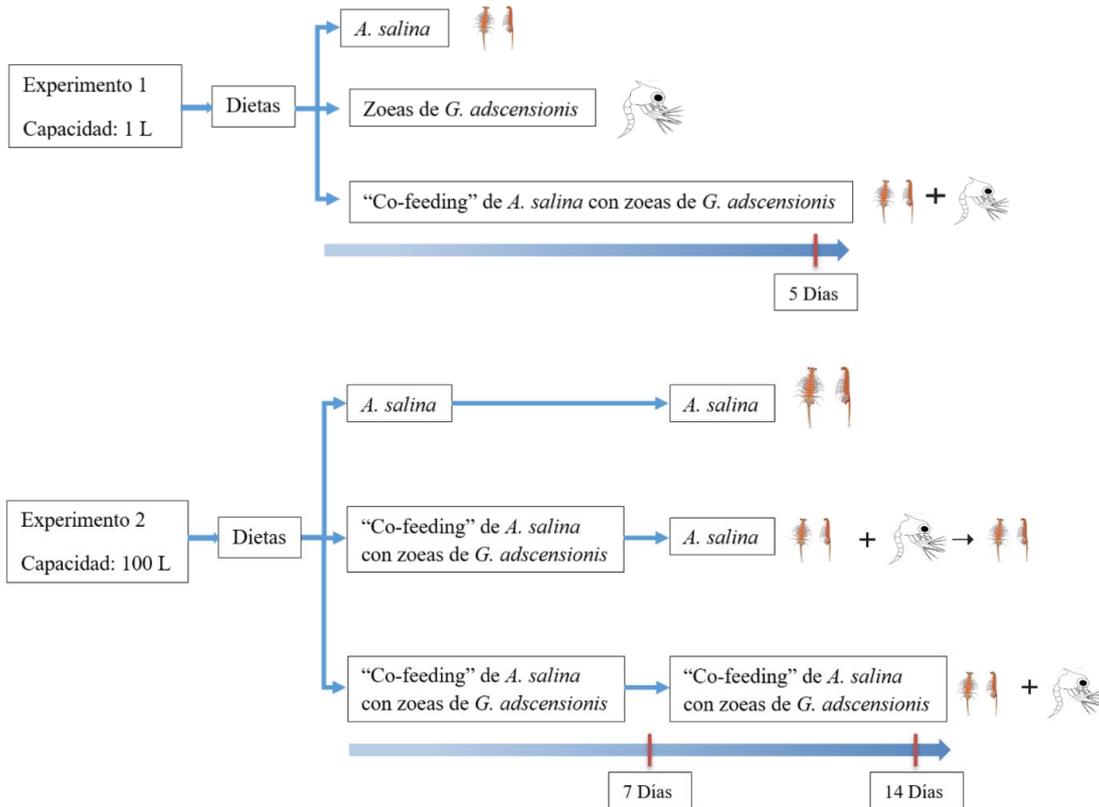
Para determinar la supervivencia, se realizó el recuento manual de paralarvas vivas para cada uno de los tanques. El recuento se realizó traspasando las paralarvas a un recipiente de menor tamaño y de color blanco para mejorar la visibilidad. El % de supervivencia se calcula como:
$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de paralarvas finales}}{\text{N}^\circ \text{ de paralarvas totales iniciales}} \times 100.$$

Figura 3. Detalle de la distribución de tanques de los Experimentos 1 y 2. Experimento 1 (A) y Experimento 2 (B)



Fuente: Joel Díaz del Rosario

Figura 4. Esquema del diseño experimental



Experimentos preliminares de enriquecimiento de presas vivas

Adicionalmente, con motivo de valorar como influyen diferentes enriquecimientos sobre la microbiota de las presas empleadas en este estudio, se llevaron a cabo diferentes enriquecimientos de las presas utilizadas. Tanto en *A. salina* (Figura 5) como en zoeas de *G. adscensionis* se llevó cabo un enriquecimiento con *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis aff.* (T-Iso), para comparar el efecto de emplear alga liofilizada o fresca. Dicho experimento se hizo por triplicado, empleando como grupo control *A. salina* o *G. adscensionis* sin enriquecer y como grupos experimentales, *A. salina* o *G. adscensionis* enriquecida con T-Iso vivo y T-Iso liofilizado. Asimismo, se llevó a cabo un ensayo para determinar el efecto de alimentación con rotíferos sobre la microbiota de zoeas de *G. adscensionis*. Para ello se realizó un ensayo por triplicado con tres tratamientos, dejando un grupo de zoeas de *G. adscensionis* en inanición, otro alimentado sólo con rotíferos, y otro alimentado con rotíferos y fitoplancton (*Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis galbana*). Los ensayos de enriquecimiento se realizaron en vasos de precipitado estériles

de 500 ml duraron 24h, tras lo cual, se recogieron muestras en tubos de propileno mediante filtración y se guardaron a -20°C.

Figura 5. Enriquecimiento de *Artemia salina* preliminar.



Fuente: Joel Díaz del Rosario

Análisis de microbiota

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el método fenol-cloroformo CTAB. De cada muestra se utilizaron 3 paralarvas (o lo equivalente en peso aproximadamente, en el caso de las muestras de presas) colocadas en tubos de eppendorf de 1,5 ml y se trataron con 500 μ L de solución tampón de lisis (50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl) y lisozima (1 mg/ml) durante 30 min a 37°C en agitación. Posteriormente se le añade 2 μ L de proteinasa K y se incubó a 55°C en agitación durante 2-3 h. Se añadió a la solución resultante 100 μ L de NaCl 5M y 70 μ L de CTAB para en los pasos posteriores poder eliminar proteína polisacáridos y restos celulares manteniendo el ADN en solución. Luego, el ADN fue separado con una extracción de fenol/cloroformo/alcohol isoamilo (0,7 ml). Por último, el ADN obtenido se precipitó con isopropanol (1400 μ L) usando una microcentrífuga, se retiró el sobrenadante procurando no dañar el pellet resultante y se resuspendió con 100 μ L de tampón TE (10 mM de Tris pH 8.0 y 1 mM de EDTA) para su posterior congelación a -20°C.

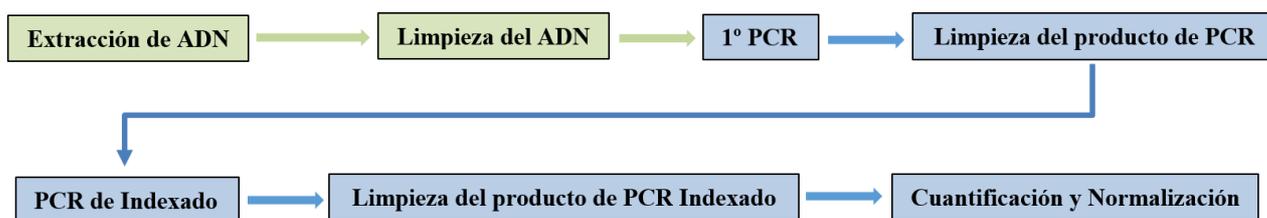
Purificación de ADN con AMPure XP beads

Las muestras correspondientes a paralarvas de pulpo poseen un alto contenido en melanina, proveniente de los sacos de tinta, la cual coeluye con el DNA durante la extracción. La melanina es un potente inhibidor de la polimerasa termoestable, por ello,

a fin de eliminar este compuesto y otros posibles contaminantes e inhibidores que podrían afectar a la PCR y análisis posteriores, se llevó a cabo la purificación/limpieza de las muestras de ADN. Así mismo, el protocolo de limpieza que va a ser descrito a continuación (Figura 6), también se llevó a cabo con el producto de PCR resultante de la amplificación de la región V1-V3 del gen de la subunidad pequeña del ribosoma 16S (ajustando el ratio de microesferas magnéticas y muestra) para eliminar primer-dimers y posibles subproductos que afectasen al análisis y posterior secuenciación de las muestras.

Para las muestras de paralarvas, el ADN obtenido se limpió utilizando AMPure XP beads (Beckman Coulter). Se añadió 1,8 μ L de AMPure XP por cada 1 μ L de muestra. Tras la unión de las beads magnéticas al ADN, se procedió a la retirada del sobrenadante, seguido de dos limpiezas con etanol (75%) para eliminar posibles contaminantes. Por último, se usó Tris-HCl (10 mM 8,5 pH) para eluir y resuspender el ADN unido a las beads magnéticas, el cual se transfirió a una placa nueva y se guardó a -20°C .

Figura 6. Esquema del flujo de trabajo en la preparación de librerías.



Amplificación de la región V1-V3

La PCR se realizó a partir de ~ 10 - 20 nanogramos (3μ l) de ADN usando los primer universales *(Forward: 5' *TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-AGMGTTYGATYMYGGCTCAG*; Reverse: 5' *GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-ATTACCGCGGCTGCTGG*) para la amplificación de la región hipervariable V1-V3 del gen de la subunidad pequeña del ribosoma 16S *(resaltado en negrita la secuencia locus específica y en cursiva región de unión a los adaptadores (“overhang adapter sequence”)). La amplificación por PCR se llevó a cabo con un volumen final de 20μ L conteniendo: 10μ L de mezcla de reacción con polimerasa termoestable (Accustart II PCR SuperMix 2x), $0,6\mu$ L de cada primer (concentración final 300 nM), $5,8\mu$ L de H_2O calidad PCR y 3μ L de muestra. El proceso de amplificación fue realizado en un termociclador (VWR Xt96) en el que las condiciones de la PCR fueron las siguientes: activación inicial de la

polimerasa a 95°C durante 5 minutos, seguido por 32 ciclos: desnaturalización a 94 °C, 30s, anillamiento de los primers a 55°C, 30s, extensión de los primers a 72°C, 45s, y una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Además de las muestras objeto de estudio en todas las PCRs realizadas se añadió un control negativo y un control positivo. Como control negativo se utilizó la mezcla de reacción en ausencia de DNA (adición de 3 µl de agua en su lugar) y como control positivo DNA purificado de un cultivo de *Escherichia coli*.

Para verificar el tamaño de amplicón y la ausencia de amplificación inespecífica se llevó cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE1x (100V -30 min).

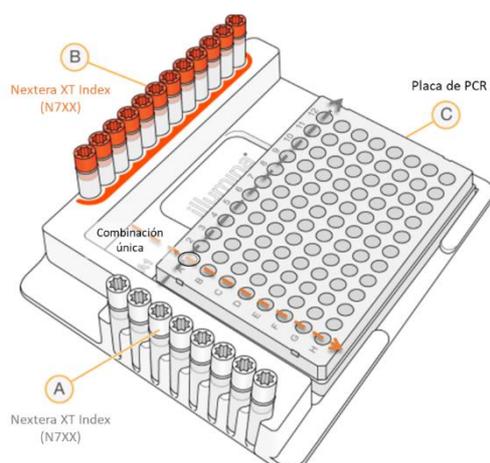
Limpieza e Indexado

Utilizando las microesferas magnéticas AMPure XP, purificamos el amplicón 16S V1 y V3 para limpiarlo de cebadores y dímeros de cebadores. Siguiendo los pasos descritos anteriormente para limpieza con AMPure XP, si bien en esta ocasión se emplearon 0.8 µl por 1 µl de producto de amplificación. De esta manera se hace una selección por tamaño quedando excluidos fragmentos de menos de 150 pb. El producto limpio se resuspendió en un volumen final de 25 µl.

Una vez se ha limpiado el producto, se realiza la PCR de Indexado, para añadir los índices duales (que permiten "etiquetar" las muestras de forma individual) y los adaptadores de secuenciación utilizando el kit de índices de Nextera XT de Illumina (Figura 7).

Para ello se transfieren 5 µl del producto de PCR limpio a una nueva placa con la siguiente mezcla de reacción: 25µl de Accustart Supermix (2x), 10 µl de agua calidad PCR, 5 µl Nextera XT Index Primer 1 (N7xx) y 5 µl Nextera XT Index Primer 2 (S5xx). Para la adición de los primers de indexado, es importante añadir a cada pocillo el índice correspondiente, siguiendo el esquema detallado bajo estas líneas.

Figura 7. Esquema de inclusión de los índices.



Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: activación inicial de la polimerasa a 95°C durante 5 minutos, seguido por 12 ciclos: desnaturalización a 94 °C, 30s, anillamiento de los primers a 55°C, 30s, extensión de los primers a 72°C, 45s, y una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Tras la PCR de indexado se realizó la limpieza del producto de PCR indexado, utilizando las microesferas magnéticas AMPure XP, siguiendo los pasos descritos con anterioridad, empleando en esta ocasión 1,12 µl por 1 µl de producto indexado, resuspendiendo en un volumen final de 25 µl.

Después de cada limpieza, para verificar la ausencia de primer-dimer, se llevó cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE1x (100V -30 min).

Cuantificación, normalización y “pooling”

Las muestras se cuantificaron por fluorimetría (Synergy LX Multi-Mode Reader), utilizando SYBER 100X como fluoróforo específico de unión al dcADN, y TE1X como buffer de reacción (Mezcla de trabajo 2 µl y 198 µl de TE). La concentración nanomolar de las muestras (nM) se calculó en base a la siguiente fórmula.

$$nM = \frac{\left(\text{Concentración en } \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right)}{\left(660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \text{Tamaño medio de las librerías} \right)} \times 10^6$$

Las muestras se combinaron a una concentración equimolar (“pooling”), y la mezcla o pool resultante se diluyó a una concentración de 20 nM y se envió a un servicio externo (Macrogen Inc.) para su secuenciación en la plataforma Illumina MiSeq (Paired end x 300).

Análisis de los datos y estudio estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa RStudio 4.1.2. El efecto del tratamiento sobre peso seco e IGR tras 7 y 14 días se evaluó usando un ANOVA de una vía. Así mismo se aplicó el mismo test para evaluar la supervivencia a fin de experimento. En ambos casos se comprobaron las premisas de Normalidad y homocedasticidad, para ello se aplicó un test de normalidad Shapiro-Wilk y se comprobó la distribución de los residuales visualmente (qqplot), y para evaluar la homogeneidad de las varianzas se utilizó el test de Bartlett. Para determinar las diferencias entre grupos se aplicó un Tukey post hoc. Para aquellas variables que no cumplieron las premisas de homocedasticidad y/o Normalidad, se llevó a cabo un test no paramétrico de Kruskal-Wallis, y se empleó el

test de Mann-Whitney U para la comparación por pares entre tratamientos, aplicándosele la corrección de Bonferroni.

Para la visualización y graficado de los resultados se ha empleado el paquete de R, ggplot2 (v. 3.3.6)

Secuenciación y análisis de las secuencias

El procesamiento de las secuencias se llevó a cabo usando DADA2 (Callahan et al., 2016). Se examinó la calidad de las secuencias, se truncó en función de la calidad de las mismas ($Q \text{ score} \geq 20$) y se eliminaron los primeros 20 pb iniciales y finales para eliminar cebadores y posible contaminación por adaptadores. El amplicón V1-V3 tiene un tamaño medio de unos 490 pb lo que es un factor limitante cuando se lleva a cabo secuenciación con un MiSeq. En nuestro caso tras truncar las secuencias, las lecturas apenas superponían por lo que la fusión por pares no fue posible ya que supondría la pérdida masiva de secuencias. Existen dos posibilidades para hacer frente a esta situación, o bien se hace un filtrado de calidad más laxo no truncando la longitud de las secuencias, o se prosigue con el análisis sólo empleando las lecturas “Forward”. Dado que las calidades son bastante bajas al final de las lecturas “Reverse”, conservar todo eso dañaría la sensibilidad del análisis, por lo que en este caso se ha optado por proseguir sólo con las secuencias filtradas “Forward”. Se eliminó el ruido y las secuencias quiméricas, y las secuencias no quiméricas se asignaron a variantes de secuencia de amplicón (ASV= “Amplicon sequencing variants”). La clasificación taxonómica de los ASV se realizó dentro de DADA utilizando como taxonomía de referencia Silva (v123) (Bokulich et al., 2018). Una vez realizada la asignación taxonómica y antes de proseguir con el análisis se eliminaron aquellos ASV sin asignación a nivel de Reino y Filo (NA), y aquellos asignados a Eucariotas. Los análisis de datos se realizaron en R (versión 4.1.2). Para minimizar posible el sesgo asociado a diferencias en la cobertura/profundidad de secuenciación en el cálculo de los índices de diversidad, se llevó a cabo un submuestreo aleatorio con repetición a profundidad de secuenciación equivalente correspondiente a 25000 “reads” utilizando phyloseq versión 1.36.0 (McMurdie y Holmes, 2013) (En este paso se eliminó una muestra con una profundidad de secuenciación inferior a 25000 “reads” y 59 ASV que ya no estaban presentes en ninguna de las muestras después del submuestreo aleatorio). Los índices de diversidad alfa (riqueza de Chao1 (Chao, 1984) e índice de diversidad de Shannon (Shannon, 1948)) y el índice de disimilitud de Bray-Curtis (Whittaker, 1972) también se calcularon utilizando phyloseq versión 1.36.0 Las

diferencias en la diversidad alfa (Chao1 y Shannon) entre tipos de muestras y entre tratamientos, se testaron con una ANOVA de una vía, después de verificar la normalidad (visual y estadísticamente (shapiro test)) y homogeneidad de la varianza (test de Bartlett). Cuando no se cumplieron las premisas de normalidad y/o homocedasticidad, se aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, y un test de Mann-Whitney U para la comparación por pares. La estructura de la comunidad microbiana (diversidad beta), basada en la distancia de Bray-Curtis, se visualizó mediante ordenación de escala multidimensional no métrica (NMDS). Las diferencias significativas entre los grupos se determinaron mediante un análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) con 9999 permutaciones y un límite de $p < 0,05$. También se realizó una prueba de permutación para la dispersión multivariante (PERMDISP) con el fin de determinar la existencia o no de diferencias en la dispersión de los grupos considerados. Para ambos test se empleó la versión 2.5-7 del paquete vegan (Oksanen et al., 2013). Todas las figuras se trazaron usando ggplot2 v.3.3.5 (Wickham, 2009).

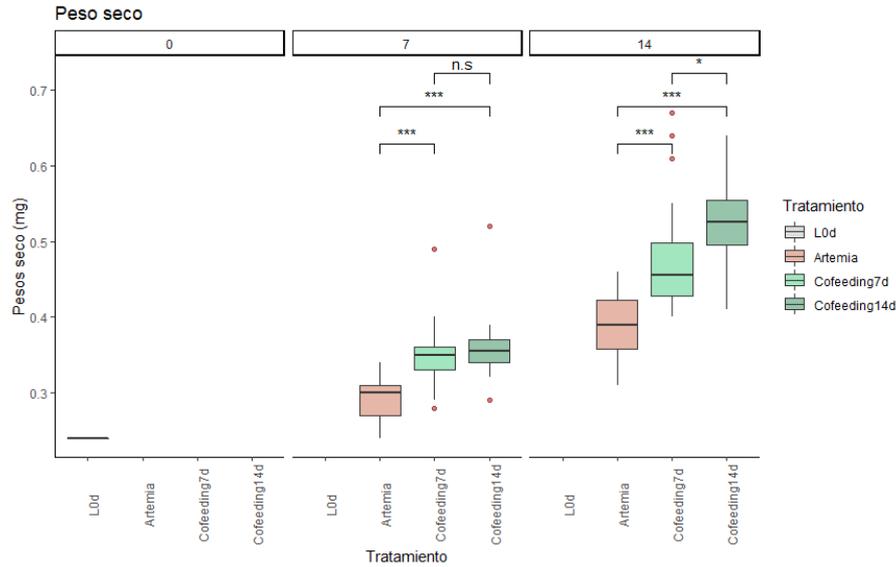
Resultados

Efecto de las presas en el crecimiento y supervivencia de las paralarvas

Se evaluó el efecto de la alimentación con diferentes presas (*A. salina* y “Co-feeding” de *A. salina* y zoeas de *G. adscensionis*) sobre el crecimiento (peso seco e IGR) y supervivencia de las paralarvas de *O. vulgaris*, cuyos resultados se presentan en la tabla 3. Los resultados muestran que la alimentación tiene un efecto significativo sobre el peso e IGR tanto a 7 días (Peso: $\chi^2=28,842$; $df= 2$, $p=5,458e-07$; Kruskal-Wallis; IGR: $F_{(2,9)}=11,87$; $p=0,00299$; ANOVA) como a 14 días (Peso: $F_{(2,57)} = 24,46$; $p= 2.14e-08$; ANOVA; IGR: $F_{(2,9)}= 11,78$; $p= 0,00307$; ANOVA). Asimismo, la alimentación también tuvo un efecto significativo sobre la supervivencia a fin de experimento (Supervivencia (%): $F_{(2,9)}= 6,651$; $p= 0,0169$; ANOVA).

Los resultados de crecimiento han mostrado diferencias significativas entre los tratamientos de “Co-feeding” frente al tratamiento con *A. salina* desde el día 7, con un incremento de peso y tasa de crecimiento diaria en los grupos suplementados con *G. adscensionis* (Figura 8). A los 14 días, se observaron diferencias significativas en el peso seco de las paralarvas entre ambos tratamientos de “Co-feeding”, y entre estos y el grupo control alimentado con Artemia, siendo el peso final de las paralarvas superior en el grupo en el que el tratamiento de “Co-feeding” se extendió durante toda la duración del experimento (14 días), frente al grupo de paralarvas bajo “Co-feeding” durante sólo 7 días, y frente a las paralarvas alimentadas con Artemia, que tuvieron el peso más bajo (Figura 8). Se observó la misma tendencia para la tasa de crecimiento diaria (IGR), con el grupo alimentado con *A. salina* mostrando las tasas de crecimiento más bajas, y el grupo de “Co-feeding” durante 14 días mostrando los más altos, con el grupo de “Co-feeding” durante 7 días mostrando valores intermedios, que no difirieron significativamente de ninguno de los otros dos tratamientos (Tabla 3).

Figura 8. Diagrama de cajas y bigotes que representa el peso seco frente al tratamiento. Los corchetes indican la significación de la comparación entre tratamientos y los asteriscos su nivel de significancia de acuerdo a los resultados de la prueba post-hoc Tukey siendo: ***= $p < 0.001$, *= $p < 0.05$, n.s= no significativo. Los puntos rojos representan datos atípicos.



Por otro lado, los resultados de supervivencia mostraron que solo hay diferencias significativas entre el tratamiento de “Co-feeding” durante 14 días y el tratamiento de Artemia, con el grupo de “Co-feeding” durante 7 días mostrando valores de supervivencia intermedios entre ambos grupos (Figura 9).

Figura 9. Diagrama de cajas y bigotes que representa la supervivencia (%) frente al tratamiento. Los corchetes indican la significación de la comparación entre tratamientos y los asteriscos su nivel de significancia de acuerdo a los resultados de la prueba post-hoc Tukey, siendo: *= $p < 0.05$, n.s= no significativo. El punto rojo representa un dato atípico.

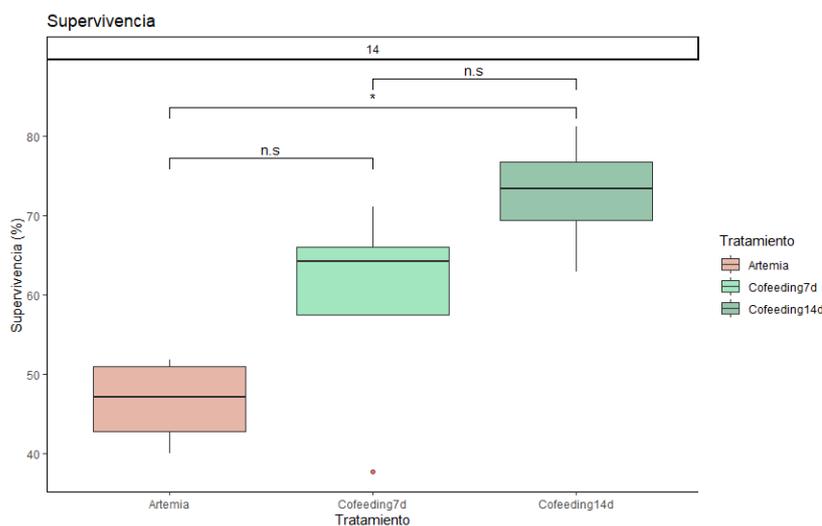


Tabla 3. Crecimiento y supervivencia de las paralarvas de *O. vulgaris* en el experimento 2

<u>Tratamiento</u>	<u>Artemia</u>	<u>“Co-feeding” 7D</u>	<u>“Co-feeding” 14D</u>
Tiempo de muestreo	7 Días		
Peso seco medio (mg)	0,29 ± 0,02 ^b	0,35 ± 0,04 ^a	0,36 ± 0,04 ^a
IGR medio	2,94 ^b	5,48 ^a	5,78 ^a
Tiempo de muestreo	14 Días		
Peso seco medio (mg)	0,39 ± 0,04 ^c	0,48 ± 0,08 ^b	0,53 ± 0,06 ^a
IGR medio	3,51 ^b	5,01 ^a	5,72 ^a
Supervivencia (%)	46,5 ^b	59,25 ^{ab}	72,7 ^a

Peso seco medio – Media ± desviación estándar de los pesos obtenidos por tratamiento. IGR – “Instantaneous growth rate” (porcentaje de aumento de peso por día). Las letras en superíndice indican diferencias significativas con un $p < 0,05$ de acuerdo con los resultados ANOVA; Tukey.

Estudio del microbioma de presas y paralarvas

Se evaluó la composición general de la microbiota de las presas (*A. salina* y zoeas de *G. adscensionis*) y de las paralarvas de *O. vulgaris* tomando en cuenta solo el tipo de muestra y sin profundizar en el tratamiento (paralarvas) o el enriquecimiento/engorde (presas). Los resultados muestran una diferencia significativa entre el microbioma de las paralarvas y el microbioma de las zoeas de *G. adscensionis* tanto en “Alpha diversity” (Chao1: $\chi^2 = 36,881$, $df = 2$, $p = 9,806e-09$; Kruskal-Wallis; Shannon: $\chi^2 = 34,913$, $df = 2$, $p = 2,623e-08$; Kruskal-Wallis) como en “Beta diversity” (PERMANOVA: $F_{(2,59)} = 9,7308$, $p = 1e-05$; PERMUTEST: $F_{(2,59)} = 19,157$, $p = 1e-04$). Estos resultados se encuentran representados en las figuras 10 y 11, respectivamente. En la Figura 12 se representa la abundancia relativa (%) de los diferentes filos atendiendo al tipo de muestra.

Figura 10. Diagrama de cajas y bigotes que representa (A) la riqueza (Chao1) y (B) diversidad (Shannon) frente a los tipos de muestra. Los corchetes indican la significación de la comparación entre muestras y los asteriscos su nivel de significación. ***= $p < 0,001$, n.s.= no significativo .

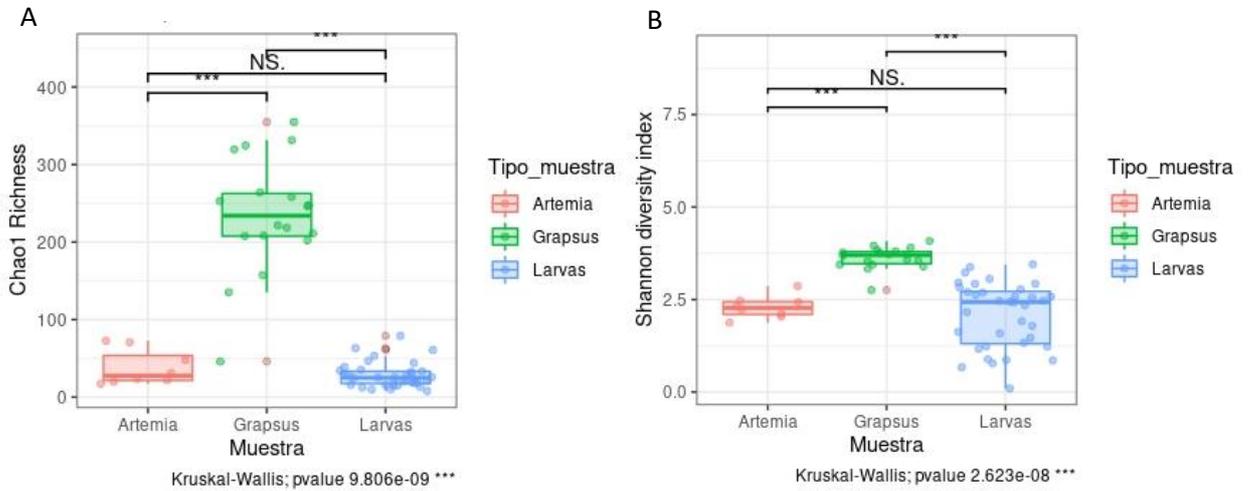


Figura 11. Representación gráfica de la estructura de la comunidad microbiana (diversidad beta) basada en la distancia de Bray-Curtis, mediante la ordenación de escala multidimensional no métrica (NMDS). Cada muestra está representada por un punto. Las elipses sombreadas representan el intervalo de confianza del 90 (línea sólida) y 95% (línea discontinua) de confianza alrededor del centroide de cada grupo.

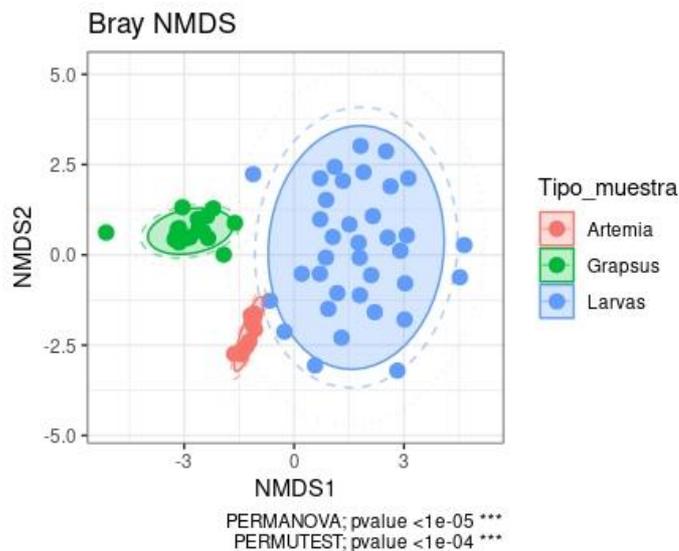
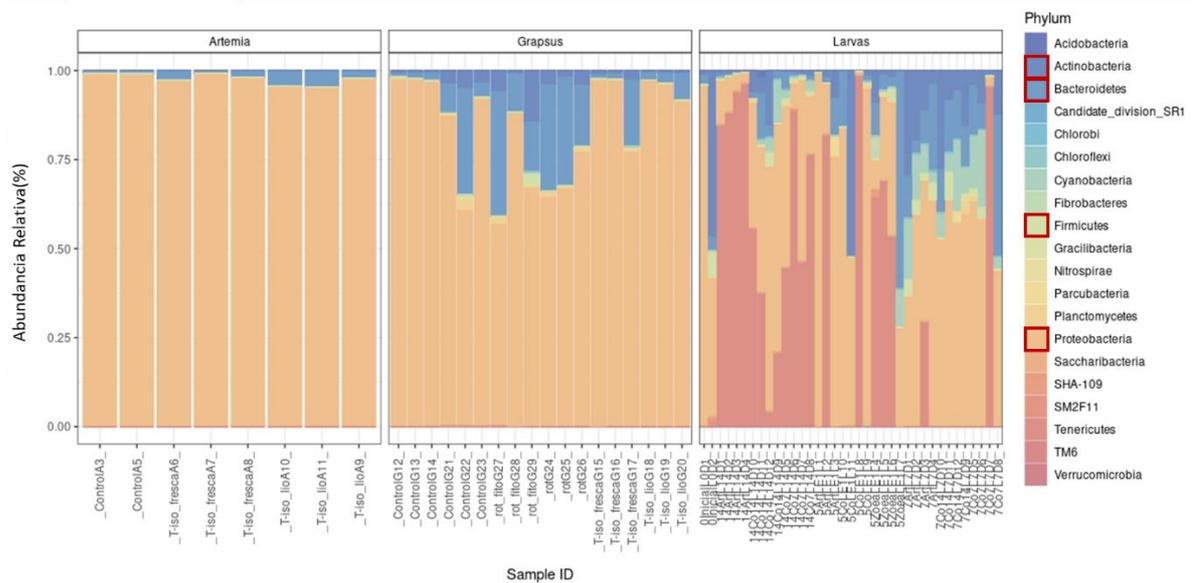


Figura 12. Diagrama de barras apiladas que muestra la abundancia relativa de los filos bacterianos dominantes (a) en los diferentes tipos de muestras. Las barras individuales representan muestras individuales. Los recuadros remarcan los filos presentes en todos los tipos de muestras analizadas con una abundancia relativa superior al 1%.



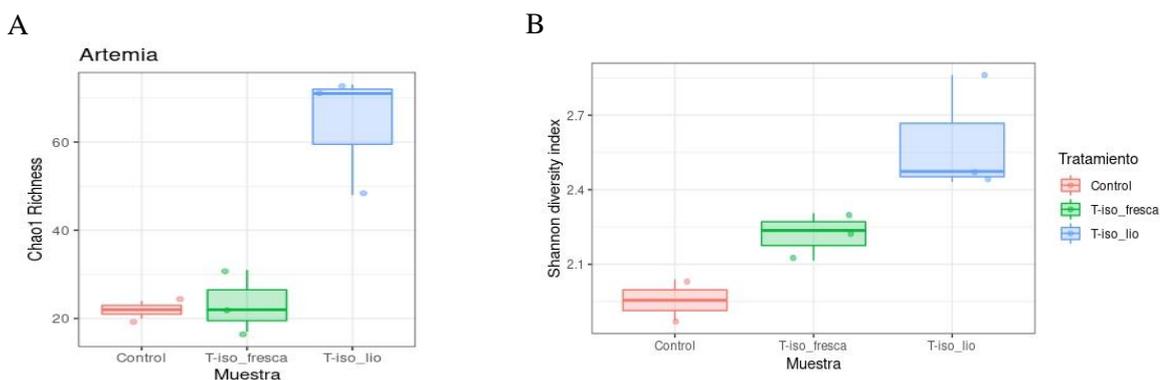
A. salina presenta un perfil microbiano bastante estable, con una baja diversidad (Figura 10), estando dominada por proteobacterias las cuales suponen >90% de los taxones presentes (Figura 12). Comparativamente, la microbiota de *G. adscensionis* presenta una diversidad específica significativamente superior a la de *A. salina* ($p > 0.001$; Figura 10), con un perfil microbiano que, si bien está dominado por proteobacterias, cuya proporción relativa varía entre un 60% y un 90% en función del protocolo de enriquecimiento y engorde, también presenta Bacteroidetes (5-30%) y Actinobacterias en una proporción variable (2-12%) (Figura 12). Las paralarvas, presentan una diversidad significativamente menor a la observada en Grapsus, con un número de especies (ASV) significativamente menor (Figura 10; $p < 0.001$), presentando valores similares a los observados en *A. salina* (Figura 10). No obstante, el gráfico del NMDS y el gráfico de abundancias relativas, evidencian que las larvas tienen un perfil distintivo, con una amplia variabilidad asociada a la edad de las paralarvas y una mayor variedad de filos presentes. Además de las proteobacterias, presentes en una proporción relativa menor que en las presas estudiadas, que en ningún caso supera el 50%, y Bacteroidetes y Actinobacterias (aparentemente más abundantes en paralarvas de 0 y 7 días), en paralarvas también encontramos Firmicutes y Verrucomicrobiota como filos con abundancias relativas superiores al 1%. Las

características específicas de las paralarvas y las diferencias a diferentes estadios de desarrollo (tiempos de muestreo) y entre los diferentes tratamientos, se tratarán en la sección correspondiente al experimento de 100 L.

Efecto del enriquecimiento de *Artemia salina* sobre la comunidad microbiana de la presa

Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 13 en el que se aprecia una tendencia creciente en la riqueza y diversidad de la microbiota de *A. salina* en presencia de T-iso, si bien debido a que una de las muestras no fue secuenciada de forma exitosa, sólo contamos con 2 réplicas para el grupo control no enriquecido, lo que imposibilita su comparación estadística. Estos resultados son por tanto descriptivos y meramente orientativos.

Figura 13. Diagrama de cajas y bigotes que representa (A) la riqueza (Chao1) y (B) diversidad (Shannon) frente al tratamiento.

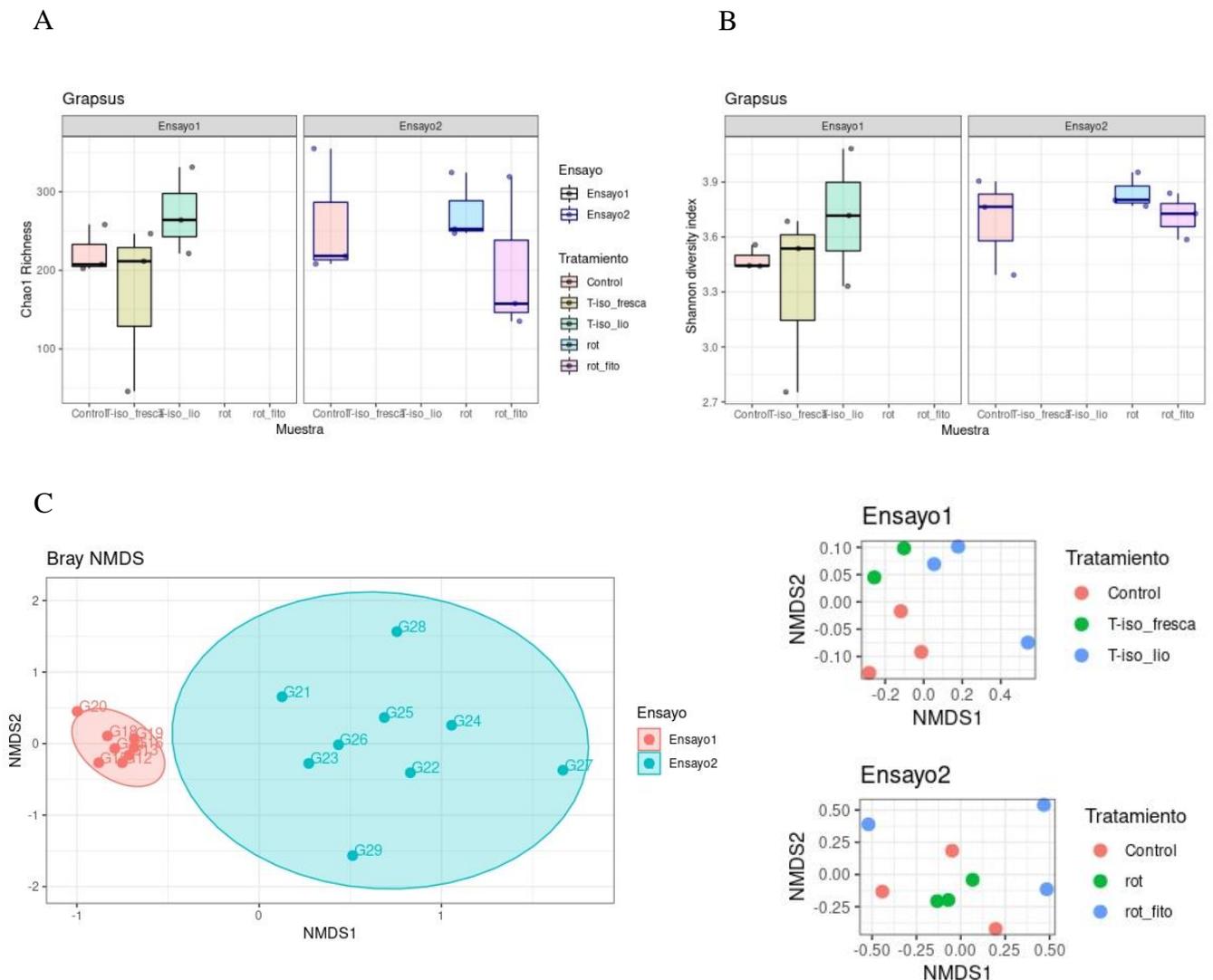


Efecto del enriquecimiento/engorde de *Grapsus adscensionis* sobre la comunidad microbiana de la presa

En el presente estudio no se observan diferencias significativas en la diversidad alpha entre tratamientos de enriquecimiento/engorde de *Grapsus adscensionis* ($p > 0.05$) (Figura 14 A y B), sin embargo existe una diferencia marginal en el índice de diversidad de Shannon ($F_{(1,16)} = 3.422$, $p = 0.083$), y una clara diferencia en la estructura de la comunidad entre ambos ensayos (PERMANOVA; Ensayo: $F_{(1, 11)} = 11.554$, $p = 1e-05$; Tratamiento: $F_{(4, 11)} = 1.75$, $p = 0.041$; Interacción: $F_{(5, 11)} = 3.7116$, $p = 1e-05$; PERMUTEST, $p = 0.0027$), existiendo una clara interacción entre el tratamiento y el ensayo en cuestión (Figura 14 C), con el grupo control difiriendo notablemente entre ambos ensayos.

Si analizamos cada ensayo de forma independiente se observa que el tratamiento de enriquecimiento con T-iso tiene un efecto significativo sobre la estructura de la comunidad (Ensayo 1: PERMANOVA: $F_{(2, 5)} = 3.5591$, $p = 0.03571$; PERMUTEST: $p > 0.05$), mientras que no es posible detectar diferencias en el engorde de 24h con rotíferos (Ensayo 2: PERMANOVA: $F_{(2, 6)} = 1.5769$, $p = 0.07207$; PERMUTEST: $p > 0.05$), (Figura 14 C).

Figura 14. Diagrama de cajas y bigotes que representa (A) la riqueza (Chao1) y (B) diversidad (Shannon) frente al tratamiento. (C) Representación gráfica de la estructura de la comunidad microbiana (diversidad beta) basada en la distancia de Bray-Curtis, mediante la ordenación de escala multidimensional no métrica (NMDS). Cada muestra está representada por un punto. En la parte superior, todas las muestras de Grapsus consideradas conjuntamente donde el color de los puntos representa el Ensayo de engorde/enriquecimiento (Ensayo 1: Enriquecimiento con T-iso; Ensayo 2: Engorde con rotíferos). Las elipses sombreadas representan el intervalo de confianza del 90 (línea sólida) y 95% (línea discontinua) de confianza alrededor del centroide de cada grupo. En la parte inferior, considerando las diferencias entre ensayos, NMDS de cada ensayo considerado de manera independiente.

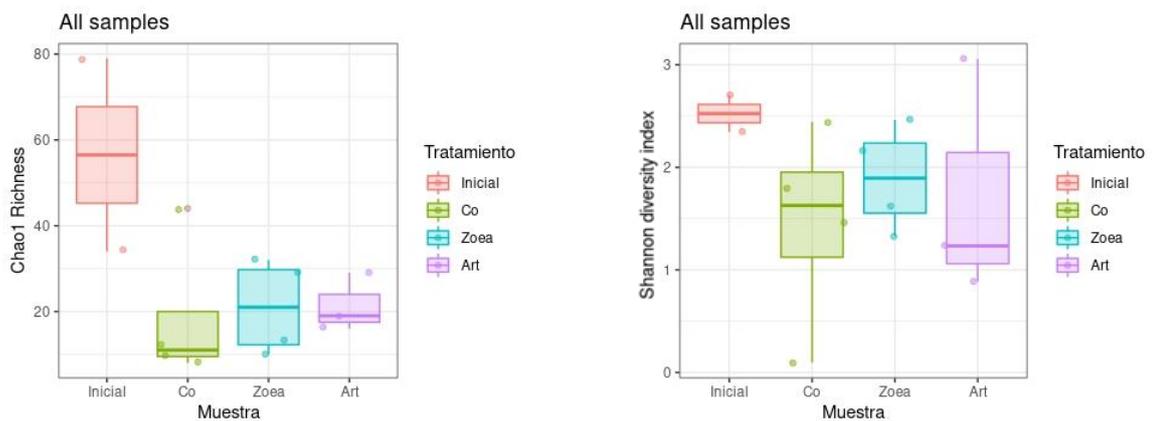


Resultados del experimento en 1L

En el gráfico se observa que aparentemente hay una pérdida de diversidad entre los 0 días (larvas recién eclosionadas) y los 5 días (Figura 15). Si bien esta comparación no fue posible ya que sólo se analizaron dos “pool” de larvas de 0d, lo que imposibilita el análisis estadístico.

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Artemia, Zoeas o “Co-feeding”) tras 5 días de alimentación. La ordenación espacial basada en la distancia de Bray Curtis (datos no mostrados) tampoco permite discriminar entre tratamientos.

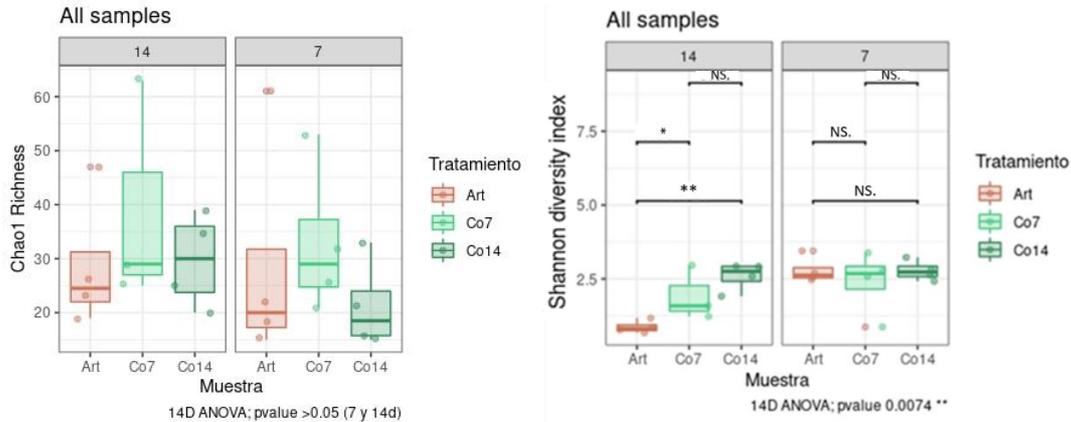
Figura 15. Diagrama de cajas y bigotes que representa la riqueza (Chao1, Shannon) a 0 días y a los diferentes tratamientos a 5 días en el experimento de 1 L



Resultados del experimento en 100L

Los resultados del experimento de 100 L muestran que, a 7 días de tratamiento, no se detectaron diferencias significativas en los índices de diversidad y riqueza ($p > 0.05$). Mientras que a 14 días de tratamiento, si bien no se observan diferencias significativas en la riqueza de Chao1 ($F_{(2,8)} = 0,533$; $p = 0,606$; ANOVA), sí se detectaron diferencias en la riqueza de Shannon ($F_{(2,8)} = 9,61$; $p = 0.00746$; ANOVA) (Figura 16).

Figura 16. Diagrama de cajas y bigotes que representa la riqueza (Chao1, Shannon) frente a los tipos de tratamiento tanto a 7 días como a 14 días. Los corchetes indican la significación de la comparación entre tratamientos y los asteriscos su nivel de significancia de acuerdo a los resultados de la prueba ANOVA de una vía.



Los resultados del PERMANOVA revelan que la estructura/composición de la comunidad microbiana difiere significativamente entre paralarvas de 7 y 14 días con independencia del tratamiento dietario (PERMANOVA: $F_{(1,21)}=4,6474$, $p=0.00064$), tal y como refleja el claro agrupamiento entre paralarvas de la misma edad (tiempo de muestreo en el NMDS (Figura 17 A). Los resultados del PERMUTEST: $F_{(1,21)}=19,157$, $p=0.0398$, indican que hay diferencias en la dispersión de los grupos.

Dada la asociación entre el tiempo de muestreo (ontogenia) y el tamaño de las paralarvas, y el efecto aparente de este sobre la microbiota encontrado en este estudio y estudios previos, para evaluar el efecto del tratamiento, se analizó cada tiempo de muestreo de forma independiente.

Si tenemos en cuenta el tratamiento (Figura 17 B) podemos observar que no hay diferencias aparentes entre grupos a 7 días, no obstante, sí parece haber un cierto grado de agrupación/estratificación asociada al tratamiento a los 14 días. Cuando consideramos sólo las paralarvas de 14 días y analizamos la correlación entre peso y supervivencia, vemos que parece existir una correlación positiva entre la ordenación en el espacio de dichos parámetros y la composición microbiana (Figura 17 C), al igual que existe una correlación positiva significativa entre Supervivencia o peso y diversidad microbiana (correlación de Pearson; Supervivencia $R=0,82$; $p\text{-value}=0.001929$ / Peso seco medio

R=0.63; p-value = 0.03902); , siendo está superior en el grupo de paralarvas sometidos a suplementación con *Grapsus adscensionis* durante 14 días.

El Diagrama de barras apiladas donde se muestra la abundancia relativa de todos los filos presentes en las paralarvas del experimento de 100 L (Figura 18) muestra que entre los 7 y los 14 días hay una pérdida de diversidad asociada a un incremento de Tenericutes, concretamente de Mycoplasmatota (Clase Mollicutes), que es muchísimo más marcado en paralarvas alimentadas con Artemia, y mucho menos marcado en paralarvas alimentadas en “co-feeding” durante los 14 días de duración del experimento.

Figura 17. Representación de la estructura de la comunidad microbiana (diversidad beta), basada en la distancia de Bray-Curtis, mediante NMDS. atendiendo al tiempo de muestreo (A) y el tipo de tratamiento (B). (C) Representación simultánea de ordenación espacial, peso y supervivencia.

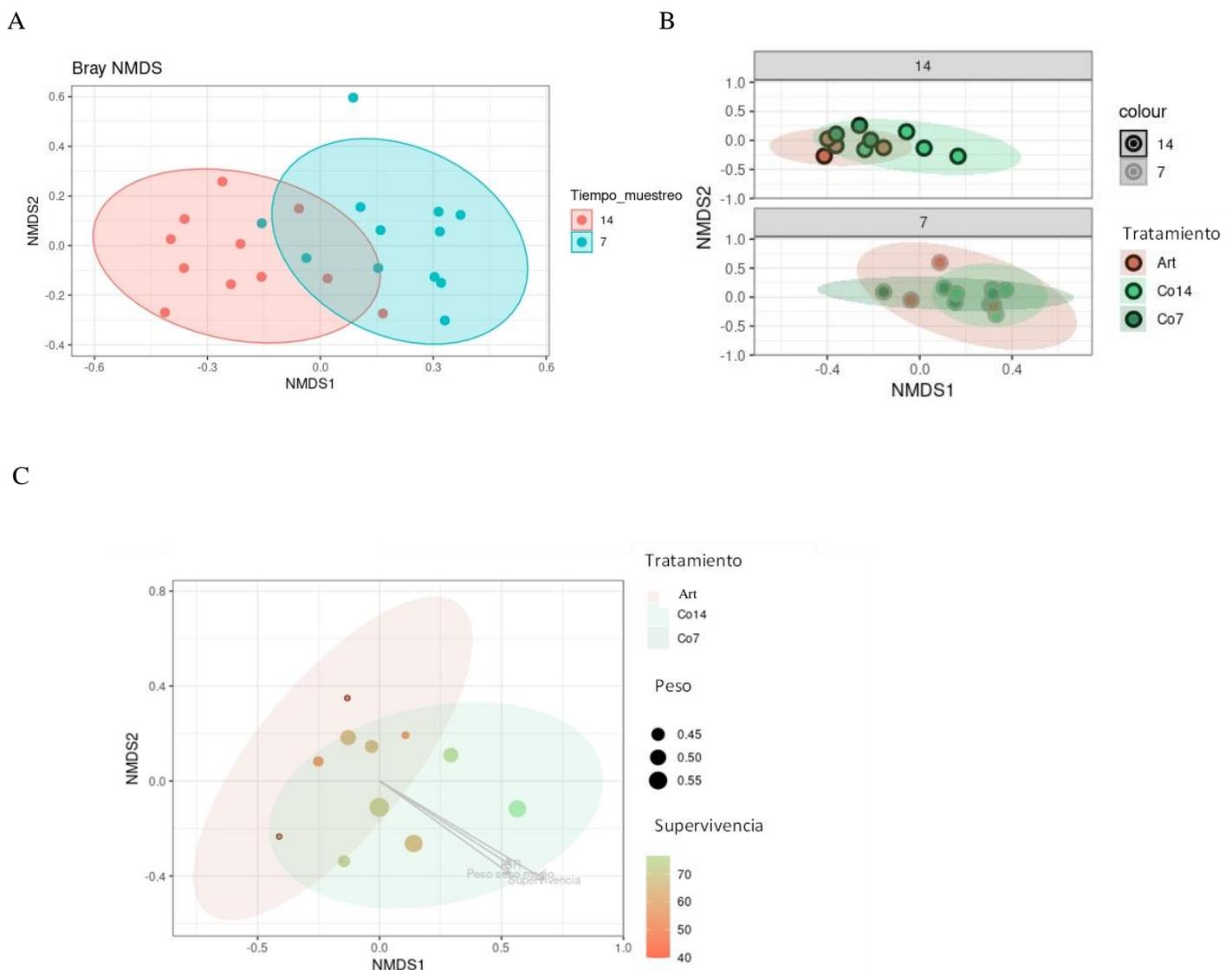
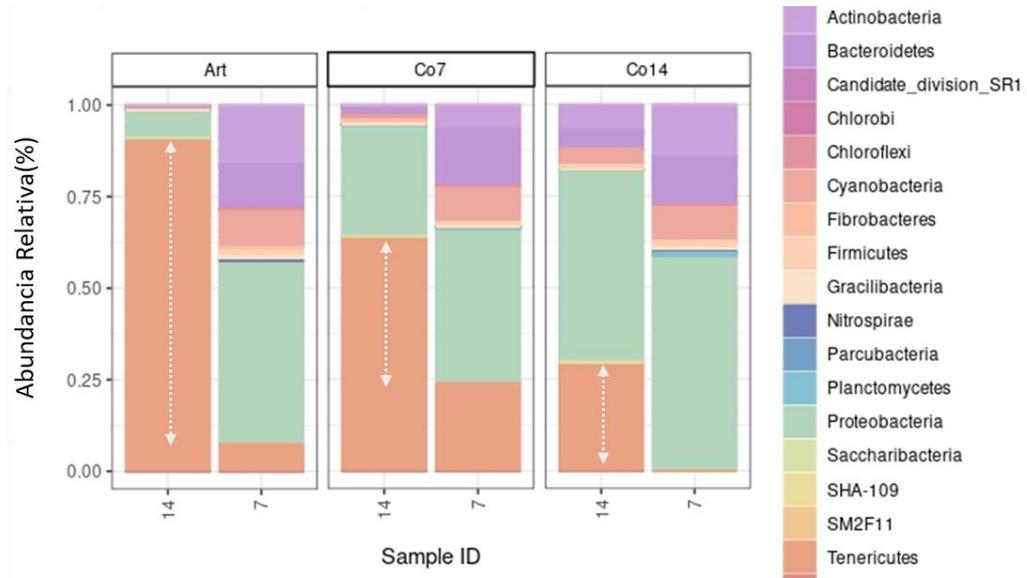


Figura 18. Diagrama de barras apiladas que muestra la abundancia relativa de los filos bacterianos según tratamiento y edad.



Discusión

Los resultados obtenidos han mostrado que el tratamiento de “Co-feeding” (*Artemia salina* y zoeas de *G. adscensionis*) durante 7 días parece ser suficiente para inducir un aumento en la tasa de crecimiento, sin embargo, es necesario mantener un periodo prolongado de “Co-feeding” (14 días) a fin de observar un aumento significativo de la supervivencia. Estos resultados concuerdan con las conclusiones a las que se ha llegado en estudios anteriores y que han mostrado que una dieta en “Co-feeding” en los primeros días de vida de las paralarvas aumenta significativamente su crecimiento y supervivencia (Iglesias et al., 2014; Roo et al., 2017; Villanueva, 1994). Otros estudios, como Carrasco et al., 2006, muestran una mejora del crecimiento, pero no así de la supervivencia. Los autores esgrimen, una mejora en la calidad nutricional de la presa y composición bioquímica de las paralarvas como principal responsable de la mejora crecimiento y/o supervivencia observada. Estos estudios se realizaron utilizando periodos de tratamiento de entre 15 y 40 días (Carrasco et al., 2006; Iglesias et al., 2014; Villanueva, 1995) o empleando como presa, zoeas de *G. adscensionis* (Roo et al., 2017) ,al igual que en el presente estudio, o con zoeas de otros crustáceos decápodos como, *Maja brachydactyla*, (J. Iglesias et al., 2014) o *Pagurus prideaux* (Villanueva, 1995). En su conjunto, estos estudios muestran que el “Co-feeding” afecta positivamente al crecimiento y supervivencia de las paralarvas en los primeros días de vida, no obstante tras un periodo de tiempo prolongado, entran otras variables que pueden afectar a la supervivencia tal y como observaron Carrasco et al., 2006. Entre estas variables esta la concentración de presa, y la concentración y abundancia de lípidos en las presas, que es esencial para el correcto desarrollo de las paralarvas (Iglesias et al., 2014; Reis et al., 2021; Seixas et al., 2010). Si bien el efecto de dichas variables se ha investigado en mayor profundidad, existen otras variables a tener en cuenta como puede ser la composición microbiana, sobre la cual se han realizado escasos estudios, y la cual podría estar implicada en el correcto desarrollo de las paralarvas.

La composición microbiana juega un papel fundamental en muchos aspectos de la biología del huésped en numerosos organismos, incluidos moluscos cefalópodos (Chalifour y Li, 2021), favoreciendo, por ejemplo, la absorción de nutrientes (Iehata et al., 2015) o actuando como primera barrera frente a patógenos (Iehata et al., 2016), por lo cual no es extraño pensar que este sea el caso en las paralarvas de *O. vulgaris*.

Las presas empleadas aquí (*Artemia* spp. y zoeas de crustáceos decápodos), difieren notablemente en su perfil microbiano, tal como se observa en los resultados del presente estudio, y de acuerdo con la literatura existente, donde se muestra que las especies de *Artemia*, se caracterizan por presentar una baja diversidad microbiana, estando dominadas por especies halófilas de los géneros *Halomonas* y *Salinivibrio* (Tkavc et al., 2011), mientras que las zoeas de crustáceos decápodos presentan una microbiota diversa (Lu et al., 2022) y con una mayor similitud con la flora intestinal de las paralarvas de pulpo (Roura et al., 2017). De los resultados obtenidos cabe destacar la diferencia significativa en la dispersión de la microbiota entre los grupos considerados (*Artemia*, zoeas de *G. adscensionis* y paralarvas). La mayor dispersión intragrupo en las paralarvas refleja la variabilidad de la microbiota durante el desarrollo y ontogenia de las mismas, ya que se incluyen larvas de 0, 5, 7 y 14 días, las cuales presentan un perfil microbiano marcadamente diferente como se pudo observar en el experimento a 14 días. La baja dispersión en el grupo de *Artemia* refleja, la estabilidad de su microbiota con independencia del protocolo de enriquecimiento empleado. La diferenciación clara entre los dos ensayos de enriquecimiento de zoeas de *G. adscensionis*, refleja que ambos ensayos se realizaron con zoeas correspondientes a diferentes puestas (hembras) y pone de manifiesto la existencia de una variabilidad basal en la composición microbiana de esta presa. Esta variabilidad basal podría afectar al microbioma de las paralarvas proporcionando una mayor diversidad tal y como ocurre en las paralarvas en estado salvaje al alimentarse de una gran variedad de presas (Olmos-Pérez et al., 2017; Roura et al., 2012).

En el presente estudio los resultados obtenidos muestran que las paralarvas recién eclosionadas presentan una diversidad considerablemente mayor que la observada a 5 días con Filos como Proteobacterias (35-90%), Actinobacterias (10-30%), Bacteriodetes (5-8%) y Firmicutes (5-15%), entre otros. Esto coincide con lo observado por Roura et al., 2017, quien estudió la composición de la microbiota intestinal de paralarvas salvajes y cultivadas de esta especie, y describe una importante pérdida de diversidad en paralarvas cultivadas a lo largo de su desarrollo, que fue evidente a los 5 días de cultivo. Centrándonos en el efecto de la presa suministrada sobre la microbiota, podemos concluir que 5 y 7 días de tratamiento parecen ser insuficientes para producir un cambio significativo en la microbiota (como se muestra en los resultados del experimento de 1L

y el experimento de 100L a 7 días). No obstante, a 14 días se evidencia el efecto de las presas suministradas sobre el microbioma.

A los 14 días cabe destacar una pérdida de diversidad en el grupo de paralarvas alimentadas con *A. salina* respecto a las paralarvas en “co-feeding”, observándose un cambio sustancial en la estructura de la comunidad, con una colonización (o incremento de la abundancia) de *Tenericutes*, que es mucho más marcada en *Artemia*, y que presenta los valores más bajos en “Co-feeding” de 14 días. Las paralarvas que estuvieron alimentadas en “co-feeding” hasta los 7 días tienen valores intermedios, lo que sugiere que la suplementación con zoeas inicial tiene un efecto amortiguador sobre la pérdida de diversidad y el incremento de *Tenericutes*.

Tenericutes, más concretamente, *Mycoplasma* spp., son comensales oportunistas que se encuentra en la microbiota de pulpo adulto, aunque se desconoce su función (Iehata et al., 2015). Este grupo de bacterias también está presente en paralarvas salvajes, si bien en proporciones muy inferiores a las observadas en paralarvas de cultivo (Roura et al., 2017). El aumento de *Mycoplasmas* observado podría estar asociado a una falta de diversidad que favorezca el crecimiento de estas bacterias oportunistas (Michaud et al., 2009), y/o a la muerte de *Artemias* y paralarvas en el tanque de cultivo, ya que *Mycoplasmas* son oportunistas saprofitos que se verían favorecidos por la presencia de materia orgánica en descomposición (Sykes, 2013). Entrando pues en un bucle de retroalimentación negativa, ya que las paralarvas alimentadas con *Artemia*, presentan una mayor mortalidad, lo que favorecería el incremento de estas bacterias y podría tener un efecto perjudicial sobre la supervivencia. Si bien, la mayor diversidad microbiana de las zoeas de *G. adscensionis*, amortiguaría este efecto.

Considerando, lo discutido hasta ahora, y la correlación significativa entre la diversidad microbiana y los parámetros de crecimiento y supervivencia encontrados en este estudio, podemos concluir que la utilización de monocultivos de *Artemia* spp. como presa viva en el cultivo de paralarvas de pulpo, además de afectar al crecimiento y supervivencia por proporcionar una calidad nutricional inadecuada (Garrido et al., 2018; Iglesias et al., 2014; Navarro et al., 2014; Reis et al., 2021), puede afectar a la aptitud y potencial de crecimiento de las paralarvas al ocasionar una disbiosis (desbalance del equilibrio microbiano) que actuaría como vector o como facilitador de la aparición de patógenos oportunistas, y que podría afectar negativamente a las capacidades metabólicas de las

paralarvas. La suplementación o “Co-feeding” con zoeas de crustáceos decápodos, además de aportar un valor nutricional adicional (Garrido et al., 2018), contribuye a diversificar la comunidad microbiana de las paralarvas cultivadas.

Conclusiones

- Un tratamiento de “Co-feeding” (*Artemia salina* y zoeas de *G. adscensionis*) durante 7 días parece ser suficiente para manifestar un aumento en la tasa de crecimiento, si bien, para la supervivencia es necesario mantener un periodo prolongado de “Co-feeding” (14 días) a fin de observar un aumento significativo de la misma.
- Las presas empleadas (*A. salina* y zoeas de *G. adscensionis*), difieren notablemente en su perfil microbiano. *Artemia*, se caracterizan por presentar una baja diversidad microbiana, estando dominada por el Filo Proteobacteria y las zoeas de *G. adscensionis* presentan una microbiota diversa, con una mayor similitud con la flora intestinal de las paralarvas de pulpo y con una variabilidad basal correspondiente a diferentes puestas.
- La mayor diversidad microbiana que aportan las zoeas de *G. adscensionis*, es capaz de amortiguar el posible efecto perjudicial que puede causar una sobrepoblación de Tenericutes (*Mycoplasma*) en el microbioma de las paralarvas.
- La suplementación o “Co-feeding” con zoeas de crustáceos decápodos, además de aportar un valor nutricional adicional (no aportado en una dieta exclusiva de *Artemia* spp.), contribuye a diversificar la comunidad microbiana de las paralarvas cultivadas, incrementando así su ratio de supervivencia.

Bibliografía

- Abdelfattah, A., Malacrinò, A., Wisniewski, M., Cacciola, S. O., y Schena, L. (2018). Metabarcoding: A powerful tool to investigate microbial communities and shape future plant protection strategies. *Biological Control*, 120(March 2017), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.009>
- Apprill, A. (2017). Marine animal microbiomes: toward understanding host–microbiome interactions in a changing ocean. *Frontiers in Marine Science*, 4, 222.
- Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., y Gregory Caporaso, J. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1), 1–17.
- Callahan, B. J., Sankaran, K., Fukuyama, J. A., McMurdie, P. J., y Holmes, S. P. (2016). Bioconductor workflow for microbiome data analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Research*, 5.
- Carrasco, J. F., Arronte, J. C., y Rodríguez, C. (2006). Paralarval rearing of the common octopus, *Octopus vulgaris* (Cuvier). *Aquaculture Research*, 37(15), 1601–1605. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01594.x>
- Chalifour, B., y Li, J. (2021). A Review of the Molluscan Microbiome: Ecology, Methodology and Future. <https://doi.org/10.4002/040.063.0208>, 63(2), 285–304. <https://doi.org/10.4002/040.063.0208>
- Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 265–270.
- de la Cruz-Leyva, M. C., Zamudio-Maya, M., Corona-Cruz, A. I., González-de la Cruz, J. U., y Rojas-Herrera, R. (2011). A method for isolating RNA from metabolically active bacterial flora associated with octopus. *Letters in Applied Microbiology*, 53(1), 8–13. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03057.x>
- de Moraes Lenz, T., Escanéz Pérez, A., Tur, R., Delgado, A., Évora, C., y Almansa, E. (2019). First attempts of the use of intake tracers in encapsulated diets with chitosan for octopus paralarvae. *Aquaculture Research*, 50(10), 3070–3073. <https://doi.org/10.1111/are.14234>
- Ezenwa, V. O., Gerardo, N. M., Inouye, D. W., Medina, M., y Xavier, J. B. (2012). Animal Behavior and the Microbiome. *Science*, 338(6104), 198–199. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1227412>
- Fernández-Álvarez, F., Machordom, A., García-Jiménez, R., Salinas-Zavala, C. A., y Villanueva, R. (2018). Predatory flying squids are detritivores during their early planktonic life. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21501-y>
- Fjellheim, A. J., Playfoot, K. J., Skjermo, J., y Vadstein, O. (2007). Vibrionaceae dominates the microflora antagonistic towards *Listonella anguillarum* in the intestine of cultured Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture*, 269(1–4), 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.021>
- Forney, L. J., Zhou, X., y Brown, C. J. (2004). Molecular microbial ecology: Land of the one-eyed king. *Current Opinion in Microbiology*, 7(3), 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.015>
- Garrido, D., Martín, M. V., Rodríguez, C., Iglesias, J., Navarro, J. C., Estévez, A., Hontoria, F., Becerro, M., Otero, J. J., Pérez, J., Varó, I., Reis, D. B., Riera, R., Sykes, A. V., y Almansa, E. (2018). Meta-analysis approach to the effects of live prey on the growth of *Octopus vulgaris* paralarvae under culture conditions. *Reviews in Aquaculture*, 10(1), 3–14. <https://doi.org/10.1111/raq.12142>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., y DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Iehata, S., Valenzuela, F., y Riquelme, C. (2015). Analysis of bacterial community and bacterial nutritional enzyme activity associated with the digestive tract of wild Chilean octopus (*Octopus mimus* Gould, 1852). *Aquaculture Research*, 46(4), 861–873. <https://doi.org/10.1111/are.12240>
- Iehata, S., Valenzuela, F., y Riquelme, C. (2016). Evaluation of relationship between Chilean octopus

- (*Octopus mimus* Gould, 1852) egg health condition and the egg bacterial community. *Aquaculture Research*, 47(2), 649–659. <https://doi.org/10.1111/are.12525>
- Iglesias, J., Otero, J. J., Moxica, C., Fuentes, L., y Sánchez, F. J. (2004). The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: Paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International*, 12(4–5), 481–487. <https://doi.org/10.1023/B:AQUI.0000042142.88449.bc>
- Iglesias, J., Pazos, G., Fernández, J., Sánchez, F. J., Otero, J. J., Domingues, P., Lago, M. J., y Linares, F. (2014). The effects of using crab zoeae (*Maja brachydactyla*) on growth and biochemical composition of *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) paralarvae. *Aquaculture International*, 22(3), 1041–1051. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9725-7>
- Iglesias, José, Villanueva, R., y Fuentes, L. (2014). Cephalopod culture. *Cephalopod Culture*, 427–450. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-8648-5>
- Janda, J. M., y Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- 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., y Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Kang, W., Kim, P. S., Tak, E. J., Sung, H., Shin, N.-R., Hyun, D.-W., Whon, T. W., Kim, H. S., Lee, J.-Y., Yun, J.-H., Jung, M.-J., y Bae, J.-W. (2022). Host phylogeny, habitat, and diet are main drivers of the cephalopod and mollusk gut microbiome. *Animal Microbiome*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00184-x>
- Koch, E. J., Miyashiro, T., McFall-Ngai, M. J., y Ruby, E. G. (2014). Features governing symbiont persistence in the squid-vibrio association. *Molecular Ecology*, 23(6), 1624–1634. <https://doi.org/10.1111/mec.12474>
- Lee, J. J., Kim, T. Y., Choi, S. H., y Kim, B. S. (2017). Analysis of the bacterial microbiome in the small octopus, *Octopus variabilis*, from South Korea to detect the potential risk of foodborne illness and to improve product management. *Food Research International*, 102(July), 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.084>
- Legrand, T. P. R. A., Catalano, S. R., Wos-Oxley, M. L., Stephens, F., Landos, M., Bansemer, M. S., Stone, D. A. J., Qin, J. G., y Oxley, A. P. A. (2018). The inner workings of the outer surface: skin and gill microbiota as indicators of changing gut health in yellowtail kingfish. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2664.
- Lu, Z., Ren, Z., Lin, W., Shi, C., Mu, C., Wang, C., Wu, Q., y Ye, Y. (2022). Succession, sources, and assembly of bacterial community in the developing crab larval microbiome. *Aquaculture*, 548(P1), 737600. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737600>
- Lutz, H. L., Ramírez-Puebla, S. T., Abbo, L., Durand, A., Schlundt, C., Gottel, N. R., Sjaarda, A. K., Hanlon, R. T., Gilbert, J. A., y Mark Welch, J. L. (2019). A Simple Microbiome in the European Common Cuttlefish, *Sepia officinalis*. *MSystems*, 4(4), 1–15. <https://doi.org/10.1128/msystems.00177-19>
- McMurdie, P. J., y Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS One*, 8(4), e61217.
- Merrifield, D. L., y Rodiles, A. (2015). The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. In *Mucosal Health in Aquaculture*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00010-8>
- Michaud, L., Lo Giudice, A., Troussellier, M., Smedile, F., Bruni, V., y Blancheton, J. P. (2009). Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6), 1935–1946. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04378.x>
- Minich, J. J., Nowak, B., Elizur, A., Knight, R., Fielder, S., y Allen, E. E. (2021). Impacts of the Marine

Hatchery Built Environment, Water and Feed on Mucosal Microbiome Colonization Across Ontogeny in Yellowtail Kingfish, *Seriola lalandi*. *Frontiers in Marine Science*, 8, 516. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2021.676731/BIBTEX>

- Navarro, Juan C., y Villanueva, R. (2003). The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: Deviation from their natural fatty acid profile. *Aquaculture*, 219(1–4), 613–631. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00311-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00311-3)
- Navarro, Juan Carlos, Monroig, Ó., y Sykes, A. V. (2014). Nutrition as a key factor for cephalopod aquaculture. In *Cephalopod culture* (pp. 77–95). Springer.
- Norman, M. D., y Hochberg, F. G. (2005). 2005 Vol.66 Norman 127 154.pdf. 154, 127–154.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O’hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., y Wagner, H. (2013). Package ‘vegan.’ *Community Ecology Package, Version*, 2(9), 1–295.
- Olmos-Pérez, L., Roura, Á., Pierce, G. J., Boyer, S., y González, Á. F. (2017). Diet composition and variability of wild *Octopus vulgaris* and *Alloteuthis media* (Cephalopoda) paralarvae: A metagenomic approach. *Frontiers in Physiology*, 8, 321.
- Ray, A. K., Ghosh, K., y Ringø, E. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: A review. *Aquaculture Nutrition*, 18(5), 465–492. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2095.2012.00943.X>
- Reis, D. B., García-Herrero, I., Riera, R., Felipe, B. C., Rodríguez, C., Sykes, A. V., Martín, M. V., Andrade, J. P., y Almansa, E. (2015). An insight on *Octopus vulgaris* paralarvae lipid requirements under rearing conditions. *Aquaculture Nutrition*, 21(6), 797–806. <https://doi.org/10.1111/anu.12205>
- Reis, Diana B., Shcherbakova, A., Riera, R., Martín, V. M., Domingues, P., Andrade, J. P., Jiménez-Prada, P., Rodríguez, C., Sykes, A. V., y Almansa, E. (2021). Effects of feeding with different live preys on the lipid composition, growth and survival of *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture Research*, 52(1), 105–116. <https://doi.org/10.1111/are.14873>
- Roo, J., Estefanell, J., Betancor, M. B., Izquierdo, M., Fernández-Palacios, H., y Socorro, J. (2017). Effects of supplementation of decapod zoea to *Artemia* basal diet on fatty acid composition and digestive gland histology in common octopus (*Octopus vulgaris*) paralarvae. *Aquaculture Research*, 48(2), 633–645. <https://doi.org/10.1111/are.12910>
- Roura, Á., Doyle, S. R., Nande, M., y Strugnell, J. M. (2017). You are what you eat: A genomic analysis of the gut microbiome of captive and wild *Octopus vulgaris* Paralarvae and their zooplankton prey. *Frontiers in Physiology*, 8(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00362>
- Roura, Á., González, Á. F., Redd, K., y Guerra, Á. (2012). Molecular prey identification in wild *Octopus vulgaris* paralarvae. *Marine Biology*, 159(6), 1335–1345. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-1914-9>
- Sanz González, J. C. (2020). *Composición de la microbiota intestinal de diferentes grupos de cefalópodos: un meta-análisis*.
- Seixas, P., Otero, A., Valente, L. M. P., Dias, J., y Rey-Méndez, M. (2010). Growth and fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae fed with enriched *Artemia* or co-fed with an inert diet. *Aquaculture International*, 18(6), 1121–1135. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9328-5>
- Sera, H. (1972). *Bacterial flora in the digestive tracts of marine fish. II. Changes of bacterial flora with time lapse after ingestion of diet*.
- Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27(3), 379–423.
- Shcherbakova, A., Riera, R., Almansa, E., Felipe, B., Rodríguez, C., Reis, D., Andrade, J. P., y Sykes, A. V. (2011). Reproductive investment and fecundity of the Red rock crab (*Grapsus adscensionis*) in Tenerife (Canary Islands, Atlantic Ocean) (Decapoda, Grapsidae). *Vieraea Folia Scientiarum Biologicarum Canariensium*, 39(Vieraea 39), 139–147. <https://doi.org/10.31939/VIERAEA.2011.39.13>
- Sykes, J. E. (2013). Mycoplasma infections. *Canine and Feline Infectious Diseases*, 382–389.

<https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00040-5>

- Tkavc, R., Ausec, L., Oren, A., y Gunde-Cimerman, N. (2011). Bacteria associated with *Artemia* spp. along the salinity gradient of the solar salterns at Eilat (Israel). *FEMS Microbiology Ecology*, 77(2), 310–321. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01112.x>
- Villanueva, R. (1994). Decapod crab zoeae as food for rearing cephalopod paralarvae. *Aquaculture*, 128(1–2), 143–152. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90109-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90109-0)
- Villanueva, R. (1995). Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52, 2639–2650.
- Villanueva, R., y Norman, M. D. (2008). Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. *Oceanography and Marine Biology*, 46, 105–202. <https://doi.org/10.1201/9781420065756.ch4>
- Whittaker, R. H. (1972). Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, 21(2–3), 213–251.
- Wickham, H. (2009). Getting started with qplot. In *ggplot2* (pp. 9–26). Springer.
- Wilkes Walburn, J., Wemheuer, B., Thomas, T., Copeland, E., O’Connor, W., Booth, M., Fielder, S., y Egan, S. (2019). Diet and diet-associated bacteria shape early microbiome development in Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*). *Microbial Biotechnology*, 12(2), 275–288. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13323>
- Young, R. E., and R. F. H. (1988). “Larvå», «Paralarvå» and «Subadult» in Cephalopod Terminology.” In *Malacologia* (pp. 201–207).