

**Estandarización de la microbiota en peces
utilizados en investigación**

Versión española del artículo original:

**Standardizing the microbiota of fish
used in Research**

I. N. Vatsos

Laboratory Animals 2017, Vol. 51(4) 353–364
DOI: 10.1177/0023677216678825

Laboratory Animals

**THE INTERNATIONAL JOURNAL OF
LABORATORY ANIMAL SCIENCE, MEDICINE,
TECHNOLOGY AND WELFARE**

Official Journal of AFSTAL, DALAS, ECLAM, ESLAV, FELASA,
GV-SOLAS, ILAF, LASA, SECAL, SGV, SPCAL



journals.sagepub.com/home/lan

Published on behalf of Laboratory Animals Ltd.
by SAGE Publications Ltd



Este artículo ha sido traducido por: Clara Martínez Nistal PhD
Revisado por: José Luís Martín Barrasa DVM PhD
Coordinación: Jesús Martínez Palacio

Nuestro agradecimiento al Consejo de Dirección de Laboratory Animals Limited y a SECAL por el patrocinio y colaboración en esta traducción.

Estandarización de la microbiota en peces utilizados en investigación

I. N. Vatsos

Facultad de Biociencias y Acuicultura, Nord University, Bodø, Noruega.

Contacto: I. N. Vatsos, Faculty of Biosciences and Aquaculture, Nord University, PO Box 1490, Bodø 8049, Norway. Email: ioannis.vatsos@nord.no

Laboratory Animals
2017, Vol. 51(4) 353364
© The Author(s) 2016
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/
journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0023677216678825
journals.sagepub.com/home/lan



Resumen

Hasta la fecha, no se ha prestado mucha atención a los efectos de la microbiota de peces en la reproducibilidad y comparabilidad de estudios sobre peces. Factores extrínsecos e intrínsecos, como la calidad del agua, las poblaciones microbianas ambientales, dieta, perfil genético del huésped, sexo, edad y estado de estrés, afectan la microbiota de peces y crean variantes inter e intraespecíficas significativas. Las microbiotas de peces tienen una función crítica en muchos aspectos clave de la fisiología del huésped, como protección contra patógenos, digestión y desarrollo del tracto digestivo y el sistema inmune local. Por ello, se debería invertir más esfuerzo en la estandarización de los perfiles microbiológicos de los peces de investigación. En este contexto, los temas a considerar incluyen el establecimiento de líneas de peces isobióticas e isogénicas, la estandarización de condiciones de crianza y el desarrollo de pruebas apropiadas para describir adecuadamente las poblaciones microbianas. Existen muchos retos en cada uno de estos temas, y la comunidad de investigadores debe decidir qué aspectos deberían estandarizarse para cada especie y cada tipo de investigación. Para todos los estudios en los que se espera que la microbiota ejerza una influencia, será primordial llevar a cabo unos informes exhaustivos. Cada paso hacia la estandarización aumenta la calidad de los estudios y simultáneamente contribuye a reducir el número de peces utilizados en las investigaciones, lo cual es una obligación ética y legal.

Palabras clave

Peces, microbiota, estandarización

En 2010, Kilkenny *et al.*¹ propusieron las pautas ARRIVE (*Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments*), que incluyen una lista de veinte puntos en los que se describe la información breve pero esencial que todas las publicaciones, que se refieran a animales, deben contener. Uno de estos puntos requiere una descripción detallada de las características de los animales para investigación previas al estudio, incluyendo su estado microbiológico. Monitorizar y registrar el estado microbiológico de todos los animales para investigación también es obligatorio según la Directiva 2010/63/EU, ya que deben implementarse programas de vigilancia microbiológica para todos los animales de investigación. Sin embargo, hasta la fecha, la gran mayoría de los estudios referidos a peces no incluye ninguna descripción de su estado microbiológico, y rara vez se incluye información sobre pruebas que certifiquen la ausencia de patógenos importantes en peces.

El objetivo de este trabajo es, en primer lugar, subrayar por qué la microbiota normal de peces sanos es una variable experimental importante que afecta a la validez y reproducibilidad de los experimentos; en segundo lugar, discutir los problemas y retos que plantea la estandarización de la microbiota en peces para investigación.

La microbiota en peces

En estudios previos se han utilizado métodos basados en el cultivo para identificar e incluso cuantificar los grupos de microorganismos que comprende la microbiota de los peces. Sin embargo, debido a la baja cultivabilidad (a menudo <2 %) de muchas bacterias que viven en el agua, en la piel y en el intestino de los peces, también se han usado técnicas moleculares complementarias para proporcionar una visión más completa de la microbiota en peces.²⁻⁴ Tomando como base estas técnicas, muchos anaerobios

esenciales que son difíciles de cultivar representan una porción significativa de la microbiota intestinal de algunas especies de peces.⁵ Inmediatamente después de que eclosionen las larvas de peces, las bacterias presentes en el corion del huevo y en el agua comienzan a colonizar diferentes áreas del cuerpo, y esta colonización continúa a medida que los peces empiezan a alimentarse y a crecer.⁶⁻⁸ Los microorganismos se encuentran normalmente en la piel, branquias e intestino de los peces, pero su presencia también se ha registrado en otros órganos tales como el hígado y los ovarios.^{9,10} No obstante, ya que estos órganos se consideran estériles, la presencia de microorganismos generalmente indica una disrupción en los mecanismos de defensa inmunitaria y la presencia de infecciones subclínicas.

Microbiota de la piel y branquias de peces

Según numerosos estudios, existen diferencias cuantitativas y cualitativas entre las microbiotas de la piel y las branquias de los peces y la del agua en el entorno.⁶ También existen diferencias entre las comunidades de bacterias y hongos adheridas a las branquias y la piel.¹¹ Debido al entorno rico en nutrientes que proporciona la mucosa de la piel y las branquias, la densidad de microorganismos en la piel y branquias de los peces es significativamente más alta que la que se encuentra en el agua del entorno, como demuestran varios estudios que emplean métodos basados en el cultivo para analizar peces criados en peceras o en estanques.^{12,13} Basándose en estudios

previos, Austin⁹ ha registrado poblaciones de bacterias en un rango de entre 10^2 y 10^4 bacterias/cm en piel de peces y 10^6 bacterias/g en las branquias. Se han asociado cargas mayores a entornos acuáticos altamente contaminados. No obstante, debido a los métodos empleados (primordialmente métodos basados en el cultivo y escáner con microscopía electrónica), las poblaciones de bacterias investigadas en estos estudios podrían haberse subestimado.

La gran mayoría de las bacterias identificadas son Gram-negativas y aeróbicas, y son parte de los phyla Proteobacteria, Firmicutes, Cyanobacteria, Actinobacteria, y Bacteroidetes.^{8,9} Los géneros más comunes son los siguientes: *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., *Cytophaga* spp., *Flexibacter* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., y *Photobacterium* spp. Muchas de estas bacterias son patógenos oportunistas que se encuentran de forma ubicua en el entorno acuático. Tienen el potencial de causar problemas de salud en determinadas condiciones, por ejemplo cuando el sistema inmunitario del hospedador está en riesgo o cuando la temperatura del agua les es favorable.

Factores que afectan la microbiota de la piel y branquias de peces

Varios factores tanto externos como relacionados con el hospedador afectan a la densidad y composición de la microbiota de la piel y branquias de peces (Figura 1).



Figura 1: Microbiota de la piel y el tracto gastrointestinal de los peces: factores que la influyen y sus efectos. Los recuadros azules se refieren tanto a la microbiota intestinal como a la de la piel, los recuadros rojos solo a la microbiota intestinal, y el recuadro verde a la microbiota de la piel.

A pesar de que existe una especificidad hospedador-especie clara, varios factores, tales como el entorno, la estación y una serie de componentes mucosos, afectan a la microbiota de la piel y branquias de los peces.¹⁴⁻¹⁶

Además, el genotipo y sexo del hospedador parecen tener una gran influencia, lo que resulta en variaciones significativas intraespecíficas, a pesar de que se ha registrado la presencia de una población principalmente autóctona en ciertas especies tales como la trucha de manantial (*Salvelinus fontinalis*) y la panga (*Pangasius hypophthalmus*).^{16,17}

Dietas diferentes (por ejemplo pellets o dietas naturales) o la restricción de alimentos alteran la microbiota de la piel y branquias de peces, a través de la composición de la mucosa de su piel y branquias.¹² De la misma manera, un número de factores estresantes, tales como una alta densidad de población, hipoxia, o ser transportados durante cinco horas, también alteran la microbiota de la piel y branquias de peces a través de la composición de la

mucosa de su piel y branquias.^{18,19} Diferentes especies de peces son capaces de tolerar el estrés de forma distinta, y por tanto, los efectos de una serie de estresores en la microbiota de su piel y branquias pueden variar.

En mamíferos, la estimulación de una superficie mucosa puede tener como resultado una respuesta inmunitaria en otras superficies mucosas. En peces, se sabe poco sobre estas respuestas inmunitarias comunes, y es necesario ampliar las investigaciones para esclarecer estas interacciones y, en particular, determinar cómo influyen a la microbiota.

Efectos de la microbiota de piel y branquias de peces en el hospedador

En los mamíferos terrestres, la microbiota normal de la piel juega un papel defensivo importante al contrarrestar muchos patógenos potenciales. Se ha demostrado un papel similar en peces (Figura 1).^{20,21} Las bacterias beneficiosas

actúan a través de la exclusión competitiva de nutrientes y/o síntesis de compuestos antimicrobianos. La presencia de estas bacterias beneficiosas tiene un papel importante en las fases iniciales de una infección, y puede incluso contribuir a la recuperación de los peces afectados.^{20,22}

Según Hansen y Olfen, ⁶ algunas bacterias en la microbiota de la piel de peces también podrían contribuir a su locomoción al segregar mucosidad espesa que reduce la resistencia acuadínica, potenciando así los efectos de la mucosa de la piel. Esto está aún por confirmar.

La microbiota intestinal en peces

En peces, la población microbiana intestinal se ha estudiado por extenso en comparación con la microbiota de piel y branquias, y se han confirmado sus efectos sobre la digestión, metabolismo y diferentes enfermedades.^{8,23,24}

Los microorganismos que colonizan el tracto gastrointestinal de los peces pueden ser autóctonos o transitorios (o alóctonos), dependiendo de su capacidad para sobrevivir el bajo nivel de pH del estómago (dependiendo de la especie de pez) y la competición con otros microorganismos.^{4,8,23} Hay diferencias en la composición de la microbiota entre diferentes partes del tracto gastrointestinal, y estas diferencias están asociadas con los hábitos alimenticios de la especie hospedadora.^{23,25} El número de microorganismos tiende a incrementarse desde el estómago hacia la parte distal del intestino.^{9,26}

Los grupos de microorganismos que colonizan la mucosa intestinal (principalmente la microbiota autóctona) son distintos de los que se encuentran en los contenidos intestinales (principalmente microbiota alóctona) y en el agua.^{27,28} Estas diferencias son fácilmente atribuibles a propiedades específicas del microentorno de la mucosa intestinal, que proporciona una serie de recursos para que los microorganismos vivan y se propaguen.^{29,30}

Los principales grupos microbianos son bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas, aunque muchos anaerobios obligados (por ejemplo *Cetobacterium somerae*) así como algunas levaduras también están presentes.^{7,9,23,28,29,31,32} Los *phyla* bacterianos predominantes son Proteobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes. Algunos virus, incluyendo muchos bacteriófagos, también viven en el intestino de los peces.³³

Las poblaciones de bacterias cultivables en el contenido intestinal y mucosa oscilan entre colonias compuestas por 10⁶ y 10⁹ unidades (CFUs)/g, donde la población en las mucosas por lo general muestra una diversidad más

baja,^{9,23,34,35} aunque también se ha registrado lo contrario.²⁷

Hay variaciones en las cifras de microorganismos que colonizan los enterocitos; algunos enterocitos no son colonizados por prácticamente ninguna bacteria.³⁶

Igual que en la microbiota de la piel, la microbiota intestinal de los peces también comprende numerosas especies patógenas, principalmente oportunistas, tales como *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, *Aeromonas hydrophila* y *Vibrio alginolyticus*.^{32,37}

Factores que afectan a la microbiota intestinal de los peces

Por lo general, los mismos factores que afectan a la microbiota de piel y branquias de los peces afectan también a su microbiota intestinal (Figura 1). En muchos casos, no se conoce totalmente el mecanismo preciso mediante el que lo hacen.

La especie de pez condiciona en gran parte la composición de la microbiota intestinal.³⁸ También existen diferencias en los grupos bacterianos predominantes que están presentes en las especies de peces de agua dulce y de agua salada. Por ejemplo, *Aeromonas spp.* y *Pseudomonas spp.* son los géneros más comunes en muchas especies de peces de agua dulce, mientras que *Vibrio spp.* parece ser la más común en muchas especies de peces marinos.^{7,23}

La influencia de los antecedentes genéticos del hospedador en la composición de la microbiota no se ha estudiado a fondo en peces. En humanos y ratones, algunos genes del hospedador pueden alterar los perfiles inmunológicos intestinales y en consecuencia influir en la microbiota intestinal, incluidos los *phyla* predominantes Bacteroidetes y Firmicutes.³⁹ Smith *et al.*⁴⁰ observaron que las poblaciones de espinosos (*Gasterosteus aculeatus*) con mayor heterocigosidad tendían a mostrar menor variación microbiana inter-individual. Esta tendencia podría asociarse a una diversidad inmunogenética mayor entre individuos de estas poblaciones, lo que reduce la diversidad microbiana. Esta conclusión, en caso de confirmarse, podría tener serias implicaciones para la selección de perfiles genéticos de los peces utilizados en experimentación.

Dependiendo del enfoque que se use, se han registrado diferencias en las implicaciones que tiene el sexo en la microbiota intestinal de los peces. Al utilizar un método basado en el cultivo, Cantas *et al.*⁴¹ no observaron diferencias significativas en la microbiota intestinal entre machos y hembras de pez cebra (*Danio rerio*). No obstante, Bolnick *et al.*⁴² observaron diferencias significativas en la

microbiota intestinal de machos y hembras en poblaciones naturales de espinosos (*Gasterosteus aculeatus*) y percas de río (*Perca fluviatilis*) utilizando amplificación del gen 16S rRNA. Además, las diferencias en la dieta han propiciado cambios dependientes del sexo en la microbiota intestinal.

A medida que los peces atraviesan diferentes fases de su desarrollo, su microbiota intestinal también cambia, a menudo debido a cambios en su dieta.^{37,43,44} Además, la microbiota intestinal es diferente para alevines y peces sexualmente maduros, potencialmente debido a un mayor nivel hormonal.⁴¹ Según numerosos estudios, factores ambientales tales como la calidad del agua, los nutrientes disponibles, y potencial contaminación, tienen una influencia significativa en la microbiota intestinal de los peces, tanto en peces salvajes como en los criados en cautividad.^{25,45,46} Roeselers et al.³² observaron que la microbiota intestinal principal era constante en peces cebra bajo diversas condiciones en diferentes laboratorios; estos resultados son similares a aquellos obtenidos con peces que habían sido recolectados recientemente de sus hábitats naturales.

Incluso el sistema de cría afecta a la microbiota intestinal de los peces. Usando métodos moleculares biológicos, Giatsis et al.⁴⁷ examinaron los efectos de peceras de recirculación y suspensión activa en el desarrollo de la microbiota intestinal de larvas de tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*) después de alimentarse por primera vez. Aunque no se hallaron diferencias en el crecimiento larvario, conversión del alimento ni supervivencia entre ambos sistemas, se observaron diferencias significativas en las poblaciones microbianas intestinales siete días después de alimentarse por primera vez. También se observaron diferencias en las poblaciones microbianas en el agua, pero no está claro si estas estaban asociadas a las diferencias en la microbiota intestinal de los peces.

La dieta parece ser el factor más significativo con una influencia directa en la microbiota intestinal. Diferentes ingredientes, diferentes tipos de alimento (por ejemplo, alimento vivo o pellets) y diferentes aditivos (por ejemplo, vitaminas o probióticos) tienen una influencia decisiva en la comunidad microbiana del tracto gastrointestinal de los peces.⁴ Estos factores favorecen el crecimiento de ciertos grupos de microorganismos, que pueden a su vez influir en la colonización de patógenos potenciales.

En el plazo de días o semanas después de un cambio en la dieta, se producen cambios significativos en la microbiota intestinal, dependiendo de la dieta y potencialmente de la edad de los peces.^{27,48,49} La restricción de alimentos también

genera cambios en las poblaciones microbianas intestinales en un plazo de días.⁵⁰ En este último caso, los grupos bacterianos que utilizan fuentes de energía más diversas, como los Bacteroidetes, tienden a aumentar. En diferentes especies de peces, dietas diferentes parecen influir de forma distinta la microbiota autóctona y alóctona,⁵¹⁻⁵³ un fenómeno que debería estudiarse en todas las especies de peces.

El estrés podría influir la microbiota intestinal de los peces, principalmente debido a los cambios resultantes en la mucosa intestinal. En especial después de estrés severo tal y como el causado por la manipulación con red, se produce un mayor desprendimiento de mucosas, que tiene como resultado una eliminación excesiva de las bacterias autóctonas, muchas de las cuales tienen un papel significativo en la protección contra potenciales patógenos.⁵⁴ Estos cambios, combinados con cambios estructurales (por ejemplo una mayor permeabilidad transepitelial) que tienen lugar en el intestino causados por el estrés, aumentan el riesgo de colonización e invasión de patógenos potenciales.⁵⁴ En los ratones, los ritmos circadianos, en especial cuando se combinan con una dieta alta en grasas y en azúcares, afectan a la microbiota intestinal.⁵⁵ Este fenómeno aún no ha sido estudiado en peces, pero tales efectos no pueden ser excluidos y pueden tener importantes implicaciones ya que los fotoperíodos varían en diferentes instalaciones y experimentos.

Efectos de la microbiota intestinal en el hospedador

En los peces, la importancia de la microbiota intestinal para la digestión del hospedador depende del nivel trófico del mismo. Los peces herbívoros dependen de la digestión microbiana de ciertos componentes vegetales, en especial la celulosa, mientras que los peces carnívoros parecen depender menos del metabolismo microbiano intestinal.^{56,57}

La microbiota intestinal tiene un papel protector contra muchos patógenos potenciales, principalmente inhibiendo la colonización patógena y/o produciendo sustancias antimicrobianas.^{31,58} Muchas bacterias ácido lácticas, tales como *Carnobacterium divergens* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, que son partes de la microbiota autóctona de muchos peces, juegan un papel en la defensa contra patógenos tales como *Aeromonas salmonicida* y *Vibrio anguillarum*.⁵⁹ Sus poblaciones, y por tanto sus efectos, pueden verse afectados por factores tales como la nutrición, estrés y salinidad.⁵⁸

Muchas bacterias intestinales de peces sintetizan sustancias importantes que utiliza el hospedador. Por ejemplo,

Cetobacterium somerae, parte de la microbiota intestinal autóctona de muchas especies de peces como carpas y tilapias, produce vitamina B12.⁶⁰ En consecuencia estas especies de peces requieren poco o ningún suplemento de esta vitamina en su dieta.⁶¹

Estudios que han usado peces cebras libres de gérmenes han demostrado los efectos positivos de la microbiota intestinal en la renovación y diferenciación del epitelio intestinal, así como la expresión de genes de peces que tienen un papel en las respuestas inmunitarias y oxidativas al estrés, aumentando así la tolerancia al estrés.^{62,63} Además, estudios que investigan diferentes probióticos han revelado la influencia de la microbiota intestinal en el número de células caliciformes, la longitud de las vellosidades intestinales, la densidad de células T y granulocitos acidófilos en la mucosa intestinal, lisozimas séricas y niveles del complemento, y actividad bactericida.⁶⁴⁻⁶⁷

En los ratones, la microbiota intestinal también influye en la motilidad intestinal, que con probabilidad tiene lugar a través de la estimulación del sistema nervioso entérico.^{68,69}

Además, también se ha demostrado que hay comunicación entre la microbiota intestinal y el cerebro del hospedador en mamíferos.⁶⁹ La microbiota afecta al comportamiento del hospedador a través de vías nerviosas aferentes vagales, mientras que el hospedador influye en el contenido y la función de la microbiota a través de neurotransmisores ligados a receptores específicos en microorganismos. En peces, estas investigaciones están en una fase muy temprana, pero recientes estudios ya han sugerido que la microbiota intestinal influye sobre el comportamiento y las respuestas al estrés.⁷⁰

Según Mouchet et al.,⁷¹ la diversidad funcional en la microbiota intestinal (evaluada según las fuentes de carbón utilizadas) entre individuos de la misma población no está relacionada con la diversidad genética de la microbiota intestinal, sino que está influenciada por la especie de pez y su dieta. Por lo tanto, aunque varios factores pueden afectar a la composición de la microbiota intestinal en peces individuales, una población entera de peces que viva en un entorno acuático específico tiene una capacidad de degradación determinada, que estabiliza, en cierta parte, este entorno específico.

Estandarización de la microbiota en peces: problemas y retos

Hay cuatro problemas clave a la hora de considerar la estandarización de la investigación en la microbiota de

peces (Figura 2): (a) el establecimiento de líneas de peces con un perfil genético uniforme, (b) el establecimiento de líneas de peces isobióticas, (c) el establecimiento de condiciones de cría estandarizadas según las preferencias de cada especie, y (d) la monitorización y el registro apropiados del estado microbiológico de los peces para experimentación.

Establecimiento de un perfil genético uniforme

En humanos, los gemelos monocigóticos presentan similitudes significativas en lo que refiere a sus poblaciones microbianas.⁷² La genética del hospedador afecta a la microbiota a través de características heredadas tales como diferentes componentes del sistema inmunitario y composición de las mucosas.³⁹ Este tipo de interacciones también está presente en peces. Por ejemplo, un estudio de Boutin et al.¹⁷ ha revelado tres locus de rango cualitativo (QTL) en truchas de manantial asociados con las cantidades de *Lysobacter*, *Rheinheimera* y *Methylobacterium* en la piel. Estas bacterias pueden influir el número de ciertos patógenos oportunistas que se encuentran en la piel de los peces.

El amplio uso de cepas de roedores isogénicos e isobióticos para investigación ha tenido como resultado un rápido aumento en nuestro conocimiento de muchos aspectos de la fisiología humana y animal. El uso de este tipo de cepas proporciona un mayor conocimiento, facilita la caracterización de relaciones dosis-respuesta más precisas, y tiene como resultado menos resultados falsos-negativos comparado con el uso de animales exogámicos.⁷³ En lo que se refiere a la microbiota intestinal, las variaciones entre ratones endogámicos son significativamente menores que aquellas entre ratones exogámicos.⁷⁴

En peces, la práctica indica que diferentes líneas isogénicas presentan características y comportamientos significativamente diferentes.⁷⁵ En consecuencia, la selección de una línea apropiada para el estudio es de gran importancia y debería tenerse en cuenta en todo diseño experimental. Según Bongers et al.,⁷⁶ si se usan peces endogámicos en un estudio, el mejor enfoque es utilizar algunas cepas de peces endogámicos para poder extrapolar los resultados del experimento a una población exogámica más amplia. Se requieren más estudios para examinar las interacciones entre microbiotas definidas y la fisiología de los hospedadores en diferentes líneas de peces, así como la estabilidad de la microbiota a lo largo del tiempo.

La producción de líneas isogénicas implica muchos

problemas técnicos, y para algunas especies de peces de poco valor comercial, puede que esto no resulte práctico. No obstante, su uso en última instancia promoverá la reproducibilidad y contribuirá a una reducción en el número de peces usados en experimentos, tal y como señalan Grimholt *et al.*⁷⁷

Establecimiento de líneas de peces isobióticos

Idealmente, los peces usados en cualquier tipo de estudio deberían tener una microbiota totalmente caracterizada o definida. A estos animales se les designa «gnobióticos», y el término también incluye animales libres de gérmenes (o axénicos). Estos animales gnotobióticos generalmente se derivan de animales libres de gérmenes, que más tarde son colonizados con una microbiota predeterminada. Los animales que se colonizan con microbiotas recogidas de donantes criados de forma convencional también reciben el nombre de animales convencionalizados.⁷⁸ Una vez se producen, los animales isobióticos transfieren su microbiota a su descendencia, como demostraron Becker *et*

al. en ratas.⁷⁹ La mayor ventaja de usar animales gnotobióticos es el control aumentado sobre muchas variables que afectan al desarrollo de la microbiota y, en particular, a las bacterias autóctonas. Sin embargo, el proceso presenta algunas desventajas que están principalmente relacionadas con la complejidad de varios procedimientos y con el mantenimiento del estado gnotobiótico.⁸⁰

Los peces gnotobióticos, como el pez cebra, ya se han criado y utilizado en varios estudios para investigar la microbiota intestinal.^{78,80} El momento apropiado para la colonización es importante y debería establecerse para cada especie de pez. La colonización artificial debería tener lugar de forma simultánea al momento en que se produciría la colonización natural para que el desarrollo del tracto gastrointestinal no se vea alterado. Por ejemplo, Pham *et al.*⁷⁸ han determinado que el momento óptimo para la colonización en peces cebra es tres días después de la fertilización, porque este es el momento en el que los peces criados de forma convencional eclosionan de su corion y son colonizados por su microbiota. Sin embargo, hasta el momento, no se han desarrollado protocolos para

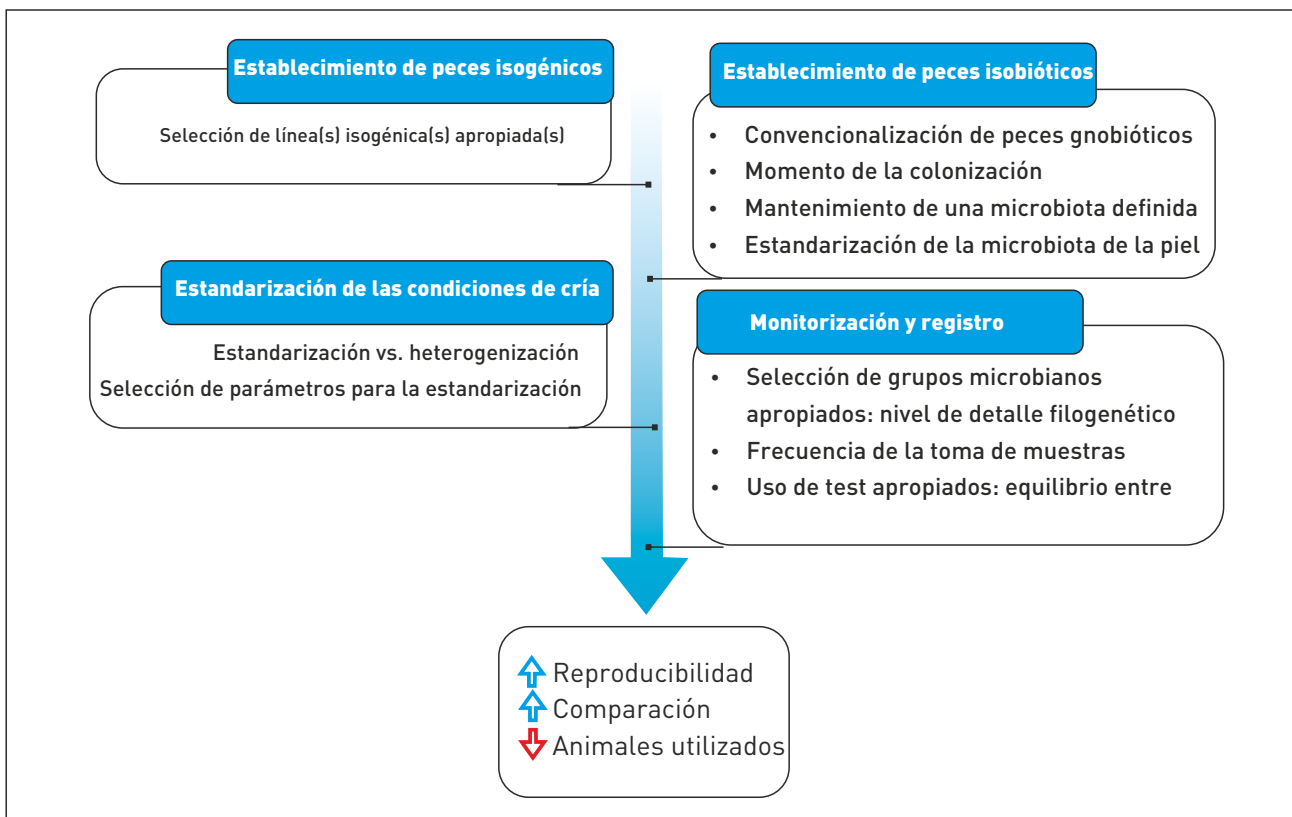


Figura 2: Estandarización de la microbiota en peces: problemas y retos

estandarizar o manipular la microbiota de la piel de los peces; en teoría, es aplicable el mismo enfoque. El mantenimiento de microbiotas definidas es un problema importante y se relaciona muy directamente con las condiciones de cría y la dieta de los peces. Además, la microbiota podría cambiar a lo largo del tiempo debido a mutaciones y/o el intercambio de información genética entre microorganismos. Por tanto, puede requerirse la recolonización a través de alimento o agua, probablemente combinada con un tratamiento antibiótico.^{81,82} Todos estos aspectos deben examinarse en diferentes especies de peces. El tratamiento con varios agentes antimicrobianos, tales como la formalina, se proponen con frecuencia como estándar para reducir el riesgo de introducir patógenos o incluso para controlar la microbiota de los peces con la llegada de nuevos animales a un laboratorio. Sin embargo, estos enfoques producen alteraciones en muchos tejidos de los peces, generan estrés y pueden incluso incrementar la mortalidad post-tratamiento, como demuestran estudios con desafíos.⁸³ Por tanto, estos métodos deberían usarse solo en caso necesario y cuando su influencia tanto en el bienestar de los peces como en la validez de los resultados haya sido probada.

Condiciones de cría estandarizadas

Los centros de investigación que utilizan peces cuentan con entornos controlados con sistemas de flujo continuo o bien de recirculación para proveerse de agua. En la mayoría de estas instalaciones crían a sus propios peces, pero a menudo también deben usar peces de fuentes externas, como granjas o criaderos comerciales. En este último caso, los peces permanecen en cuarentena durante un periodo determinado de tiempo, durante el cual puede que se les trate para eliminar patógenos comunes. En definitiva, debido a las diferentes prácticas en instalaciones diversas, los diferentes parámetros de calidad del agua (aunque estos suelen mantenerse dentro de un rango predeterminado para cada especie) y las dietas diversas, el estado microbiológico de los peces para investigación varía o se desconoce.

La estandarización ambiental entre diferentes instalaciones para investigación con animales sigue siendo un tema controvertido. Van der Staay *et al.*⁸⁴ evaluaron el uso de condiciones estandarizadas frente a heterogéneas en la experimentación animal y concluyeron que esta última no permite la detección de diferencias sutiles, y por tanto, la primera es preferible, en especial en estudios iniciales. Sin embargo, la generalización de resultados debe confirmarse

con una «amplia replicación» de estudios, en los que se examinen varios factores conocidos. Usando medidas de comportamiento en un estudio en múltiples laboratorios, Richter *et al.*⁸⁵ observaron un ratio mayor de resultados «falso-positivos» cuando se empleaba la replicación estandarizada. Por tanto, la estandarización ambiental debería sustituirse por condiciones ambientales heterogéneas y controladas. Aunque las conclusiones de Van der Staay *et al.* y Richter *et al.* difieren, enfatizan la importancia de un diseño experimental cuidadoso y el examen de todos los factores que contribuyen en el mismo antes de poder inferir ninguna conclusión. No obstante, algunas variables de cría, tales como una dieta común para cada especie de pez y el uso de agua tratada y recirculada, pueden reducir de forma significativa las variaciones intraespecíficas en la microbiota normal de los peces.

Monitorizar y registrar la microbiota en peces

El uso de animales libres de patógenos (SPF, por sus siglas en inglés) y el mantenimiento de un entorno SPF son los aspectos más importantes de cualquier programa para monitorizar la salud de los peces que se implemente en un centro de investigación. Otros factores, tales como la selección de grupos apropiados de microorganismos como objetivo, los métodos de evaluación empleados, el número de animales representativos seleccionados para su evaluación y el coste, también son decisivos para el éxito de este tipo de programa.⁸⁶ Johansen *et al.*⁸⁷ proporcionaron una visión general de los principios de un programa de monitorización de la salud de los peces en un centro de investigación. No obstante, deben tenerse consideraciones adicionales cuando se monitoriza y registra la microbiota normal de los peces para incrementar la reproducibilidad de los experimentos, y también deberían hacerse los ajustes necesarios en base a la especie de pez. La importancia de estandarizar, monitorizar y registrar la microbiota de los animales de investigación ya ha sido señalada por Eberl.⁸⁸ Este autor reunió opiniones de muchos especialistas en esta área para dar respuesta a preguntas relevantes. Todos los especialistas que reconocen el papel de la microbiota en la fisiología del hospedador estuvieron de acuerdo en la importancia de registrar la microbiota para todos los estudios, en especial en los casos en los que hay pruebas suficientes de su influencia. Dos de las preguntas iniciales planteadas por Eberl fueron: (a) qué microorganismos deberían monitorizarse, en especial en términos del nivel de detalle filogenético, y (b) con qué frecuencia debería producirse la monitorización. En peces, las respuestas a ambas preguntas dependen de la especie de pez (por

ejemplo, del nivel trófico), cómo de aislado y constante es el entorno en las instalaciones, y del tipo de estudio. Por ejemplo, si en las instalaciones se utilizan recirculación y tratamiento de agua (por ejemplo, radiación ultravioleta u ozono) y un alimento estandarizado con un contenido microbiano contenido, se podría asumir que la microbiota de la piel, branquias e intestino se mantendrán relativamente constantes si el perfil genético de los peces y el mantenimiento general también están estandarizados. En especial, los estudios nutricionales deberían, como mínimo, incluir siempre una descripción de la microbiota intestinal para todos los tratamientos (incluyendo tanto bacterias aeróbicas como anaeróbicas, así como hongos) al inicio y al final del periodo experimental. Si bien una descripción detallada de la microbiota de los peces puede no ser práctica por su coste, la lista de microorganismos objeto de estudio debería al menos incluir todos los grupos principales que tienen un papel importante en la digestión, según la especie de pez y la naturaleza del experimento. De la misma manera, las infecciones experimentales deberían incluir grupos de microorganismos con propiedades protectoras y/o inmunoestimulantes conocidas.

Cuando se llevan a cabo experimentos a largo plazo, también deberían examinarse los efectos para la microbiota de los diferentes estados de desarrollo y edades de los peces, por lo que deberían contemplarse los momentos apropiados para la toma de muestras. Según Giatsis *et al.*,⁴⁷ no existen diferencias significativas en la microbiota intestinal de peces individuales que viven en la misma pecera (en especial si los peces comparten antecedentes genéticos), ni hay diferencias entre los peces que viven en peceras replicadas mantenidas en las mismas condiciones. Aunque estas observaciones deberían confirmarse para diferentes condiciones y debería desarrollarse un protocolo estandarizado para la toma de muestras, parece que solo se requiere una muestra de tamaño relativamente pequeño para determinar el estado microbiano de un grupo homogéneo de peces.

Otro asunto importante son los métodos empleados para examinar y estandarizar la microbiota de los animales para investigación. Todos los test tienen sus limitaciones y por tanto debería usarse una combinación de los mismos para obtener una visión más precisa de las poblaciones microbianas presentes.^{4,87,88} Avances recientes en el uso de la culturomica para estudiar la microbiota intestinal humana indican que se obtienen mejores resultados con una combinación de métodos basados en el cultivo e

independientes del cultivo, en especial en el caso de microorganismos de escasa abundancia que ciertos métodos moleculares no logran detectar.^{89,90}

El coste de monitorizar de forma adecuada la microbiota de los peces usados en experimentación puede seguir resultando elevado para algunos centros, en especial si se requiere la toma frecuente de muestras. Sin embargo, este coste se verá afectado por el nivel de estandarización de la microbiota, y podría equilibrarse al reducir el número de animales requeridos para los experimentos y aumentar su reproducibilidad.

Conclusiones

Recientemente se ha empezado a prestar una mayor atención a la validez y reproducibilidad de estudios publicados, en especial aquellos en los que participan animales. Además de por razones científicas y legales, existe una obligación ética de asegurar que se usa el mínimo número posible de animales en los experimentos para obtener resultados fiables.

Uno de los factores fundamentales que afectan a la reproducibilidad, y en consecuencia la validez de cualquier experimento, es la estandarización de las condiciones experimentales. En experimentos con peces, la microbiota de los peces rara vez se incluye al describir el estado de los animales empleados, a pesar de ser bien conocida la capacidad de la microbiota de los peces para afectar al hospedador de forma notable, lo que resulta en variaciones interespecíficas y, lo más importante, intraespecíficas. A medida que avanza el conocimiento sobre el papel de la microbiota de la piel, branquias y tracto gastrointestinal, se hace más evidente la importancia de su estandarización.

Este informe subraya los problemas y retos más importantes planteados por la estandarización de la microbiota normal de los peces y su importancia en la experimentación con peces. Los peces constituyen un grupo de animales altamente diverso, y cada especie muestra distintas tolerancias y respuestas a varios factores. Los estudios usados como ejemplos en este informe solo incluyen algunas especies. Por tanto es necesaria más investigación antes de que la comunidad científica decida qué factores de los que afectan a la microbiota de cada especie son importantes para la estandarización. No obstante, la microbiota en peces es una variable experimental importante y debería ser monitorizada y registrada en todos los estudios en cuyos resultados pueda influir.

Declaración de conflicto de intereses

El/los autor(es) declaran que no existen potenciales conflictos de interés en lo que se refiere a la investigación, autoría y/o publicación de este artículo.

Financiación

El/los autor(es) no recibieron ningún aporte económico para la investigación, autoría y/o publicación de este artículo.

Referencias

- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M and Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*2010; 8: e1000412.
- Huber I, Spanggaard B, Appel KF, Rossen L, Nielsen T and Gram L. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J Appl Microbiol* 2004; 96: 117–132.
- Benhamed S, Guardiola FA, Mars M and Esteban MA. Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes. *Vet Microbiol*2014; 171: 1–12.
- Ringø E, Zhou Z, Vecino JLG, et al. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals A never-ending story? *Aquacult Nutr*2016; 22: 219–282.
- Pond MJ, Stone DM and Alderman DJ. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*2006; 261: 194–203.
- Hansen GH and Olafsen JA. Bacterial interactions in the early life stages of marine coldwater fish. *Microb Ecol* 1999; 38: 1–26.
- Sullam KE, Essinger SD, Lozupone CA, et al. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Mol Ecol* 2012; 21: 3363–3378.
- Llewellyn MS, Boutin S, Hoseinifar SH and Derome N. Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Front Microbiol*2014; 5: 207.
- Austin B. The bacterial microflora of fish, revised. *Sci World J*2006; 6: 931–945.
- Yang G, Bao B, Peatman E, Li H, Huang L and Ren D. Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish *Takifugu obscurus*. *Aquaculture*2007; 262: 183–191.
- Wang WW, Zhou ZG, He SX, et al. Identification of the adherent microbiota on the gills and skin of poly-cultured gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala* Yih). *Aquac Res* 2010; 41: 72–83.
- Landeira-Dabarca A, Sieiro C and Alvarez M. Change in food ingestion induces rapid shifts in the diversity of microbiota associated with cutaneous mucus of Atlantic salmon *Salmo salar*. *J Fish Biol*2013; 82: 893–906.
- Pakingking R Jr, Palma P and Usero R. Quantitative and qualitative analyses of the bacterial microbiota of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in earthen ponds in the Philippines. *World J Microbiol Biotechnol* 2015; 31: 265–275.
- Larsen A, Tao Z, Bullard SA and Arias CR. Diversity of the skin microbiota of fishes: evidence for host species specificity. *FEMS Microbiol Ecol*2013; 85: 483–494.
- Lokesh J and Kiron V. Transition from freshwater to seawater reshapes the skin-associated microbiota of Atlantic salmon. *Sci Rep*2016; 6: 19707.
- Le Nguyen DD, Ngoc HH, Dijoux D, Loiseau G and Montet D. Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: an application on pangasius fish from Vietnam. *Food Control*2008; 19: 454–460.
- Boutin S, Sauvage C, Bernatchez L, Audet C and Deroême N. Inter individual variations of the fish skin microbiota: host genetics basis of mutualism? *PLoS One*2014; 9: e102649.
- Boutin S, Bernatchez L, Audet C and Deroême N. Network analysis highlights complex interactions between pathogen, host and commensal microbiota. *PLoS One*2013; 8: e84772.
- Tacchi L, Lowrey L, Musharrafieh R, Crossey K, Larragoite ET and Salinas I. Effects of transportation stress and addition of salt to transport water on the skin mucosal homeostasis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*2015; 435: 120–127.
- Carbajal-González MT, Fregeneda-Grandes JM, Suárez-Ramos S, Cadenas FR and Aller-Gancedo JM. Bacterial skin flora variation and in vitro inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* in brown and rainbow trout. *Dis Aquat Organ*2011; 96: 125–135.
- Boutin S, Bernatchez L, Audet C and Deroême N. Antagonistic effect of indigenous skin bacteria of brook charr (*Salvelinus fontinalis*) against *Flavobacterium columnare* and *F. psychrophilum*. *Vet Microbiol* 2012; 155: 355–361.
- Hussein MA and Hatai K. In vitro inhibition of *Saprolegnia* by bacteria isolated from lesions of salmonids with saprolegniasis. *Fish Pathol*2001; 36: 73–78.
- Nayak SK. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquac Res*2010; 41: 1553–1573.
- Ganguly S and Prasad A. Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism. *Rev Fish Biol Fisheries*2012; 22: 11–16.
- Ye L, Amberg J, Chapman D, Gaikowski M and Liu WT. Fish gut microbiota analysis differentiates physiology and behavior of invasive Asian carp and indigenous American fish. *ISME J*2014; 8: 541–551.
- Hovda MB, Lunestad BT, Fontanillas R and Rosnes JT. Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 2007; 272: 581–588.

27. Carda-Diéguez M, Mira A and Fouz B. Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets. *FEMS Microbiol Ecol*2014; 87: 451–459.
28. Li H, Limenitakis JP, Fuhrer T, et al. The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nat Commun*2015; 6: 8292.
29. Li T, Long M, Gatesoupe FJ, Zhang Q, Li A and Gong X. Comparative analysis of the intestinal bacterial communities in different species of carp by pyrosequencing. *Microb Ecol*2015; 69: 25–36.
30. De Weirtdt R and Van de Wiele T. Micromanagement in the gut: microenvironmental factors govern colon mucosal biofilm structure and functionality. *Biofilms Microbiomes*2015; 1: 15026.
31. Gatesoupe FJ. Live yeasts in the gut: natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture*2007; 267: 20–30.
32. Roeselers G, Mittge EK, Stephens WZ, et al. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME J*2011; 5: 1595–1608.
33. He Y and Yang H. The gastrointestinal phage communities of the cultivated freshwater fishes. *FEMS Microbiol Lett*2015; 362: fnu027.
34. Kim DH, Brunt J and Austin B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Appl Microbiol* 2007; 102: 1654–1664.
35. Wu S, Gao T, Zheng Y, Wang W, Cheng Y and Wang G. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture* 2010; 303: 1–7.
36. Ringø E, Olsen RE, Mayhew TM and Myklebust R. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture*2003; 227: 395–415.
37. Ayaz A and Karatas S. Dominant aerobic bacterial community of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) larvae during weaning from Artemia to dry feed in culture conditions. *Turk J Vet Anim Sci*2010; 34: 501–506.
38. Li X, Yu Y, Feng W, Yan Q and Gong Y. Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae. *J Microbiol*2012; 50: 29–37.
39. McKnite AM, Perez-Munoz ME, Lu L, et al. Murine gut microbiota is defined by host genetics and modulates variation of metabolic traits. *PLoS One*2012; 7: e39191.
40. Smith CCR, Snowberg LK, Caporaso JG, Knight R and Bolnick DI. Dietary input of microbes and host genetic variation shape among-population differences in stickleback gut microbiota. *ISME J*2015; 9: 2515–2526.
41. Cantas L, Sørby JRT, Aleström P and Sørum H. Culturable gut microbiota diversity in zebrafish. *Zebrafish*2012; 9: 26–37.
42. Bolnick DI, Snowberg LK, Hirsch PE, et al. Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota. *Nat Commun*2014; 5: 4500.
43. Romero J and Navarrete P. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microb Ecol*2006; 51: 422–430.
44. Ingerslev HC, von Gersdorff Jørgensen L, Strube ML, et al. The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. *Aquaculture*2014; 424–425: 24–34.
45. Noornissabegum M and Revathi K. Analysis of gut bacterial flora from edible marine fishes of south east coast of India. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*2014; 3: 523–528.
46. Guerreiro I, Enes P, Rodiles A, Merrifield D and Oliveira Teles A. Effects of rearing temperature and dietary short-chain fructooligosaccharides supplementation on allochthonous gut microbiota, digestive enzymes activities and intestine health of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) juveniles. *Aquacult Nutr*2014; 22: 631–642.
47. Giatsis C, Sipkema D, Smidt H, Verreth J and Verdegem M. The colonization dynamics of the gut microbiota in tilapia larvae. *PLoS One*2014; 9: e103641.
48. Asakura T, Sakata K, Yoshida S, Date Y and Kikuchi J. Noninvasive analysis of metabolic changes following nutrient input into diverse fish species, as investigated by metabolic and microbial profiling approaches. *PeerJ* 2014; 2: e550.
49. Geurden I, Mennigen J, Plagnes-Juan E, et al. High or low dietary carbohydrate:protein ratios during first feeding affect glucose metabolism and intestinal microbiota in juvenile rainbow trout. *J Exp Biol*2014; 217: 3396–3406.
50. Xia JH, Lin G, Fu GH, et al. The intestinal microbiome of fish under starvation. *BMC Genomics*2014; 15: 266.
51. Ringø E, Sperstad S, Myklebust R, Refstie S and Kroghdal Å. Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): the effect of fish meal, standard soybean meal and a bio-processed soybean meal. *Aquaculture*2006; 261: 829–841.
52. Merrifield DL, Dimitroglou A, Bradley G, Baker RT and Davies SJ. Soybean meal alters autochthonous microbial populations, microvilli morphology and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 2009; 32: 755–766.
53. Feng J, Hu C, Luo P, Zhang L and Chen C. Microbiota of yellow grouper (*Epinephelus awoora* Temminck & Schlegel, 1842) fed two different diets. *Aquac Res*2010; 41: 1778–1790.
54. Olsen RE, Sundell K, Hansen T, et al. Acute stress alters the intestinal lining of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: an electron microscopical study. *Fish Physiol Biochem*2002; 26: 211–221.
55. Voigt RM, Forsyth CB, Green SJ, et al. Circadian disorganization alters intestinal microbiota. *PLoS One*2014; 9: e97500.
56. Zhou Y, Yuan X, Liang XF, et al. Enhancement of growth and intestinal flora in grass carp: the effect of exogenous cellulase. *Aquaculture*2013; 416–417: 1–7.
57. Clements KD, Angert ER, Montgomery WL and Choat JH. Intestinal microbiota in fishes: what's known and what's not. *Mol Ecol*2014; 23: 1891–1898.
58. Ringø E and Gatesoupe FJ. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*1998; 160: 177–203.
59. Ringø E, Løvmo L, Kristiansen M, et al. Lactic acid bacteria vs pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquac Res*2010; 41: 451–467.

60. Tsuchiya C, Sakata T and Sugita H. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Lett Appl Microbiol*2008; 46: 43–48.
61. Sugita H, Miyajima C and Deguchi Y. The vitamin B₁₂-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. *Aquaculture*1991; 92: 267–276.
62. Rawls JF, Samuel BS and Gordon JI. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 101: 4596–4601.
63. Bates JM, Mittge E, Kuhlman J, Baden KN, Cheesman SE and Guillemin K. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Dev Biol*2006; 297: 374–386.
64. Gisbert E, Castillo M, Skalli A, Andree KB and Badiola I. *Bacillus cereus* var. *toyo* promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. *J Anim Sci*2013; 91: 2766–2774.
65. Martínez-Cruz P, Ibáñez AL, Monroy-Hermosillo OA and Ramírez-Saad HC. Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiol*2012; 2012: 916845.
66. Picchietti S, Fausto AM, Randelli E, et al. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol*2009; 26: 368–376.
67. Gómez GD and Balcázar JL. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunol Med Microbiol*2008; 52: 145–154.
68. McFarland LV. Normal flora: diversity and functions. *Microb Ecol Health Dis*2000; 12: 193–207.
69. Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA and Severi C. The gut–brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol* 2015; 28: 203–209.
70. Davis DJ, Brydau EC, Gillespie CH and Ericsson AC. Microbial modulation of behavior and stress responses in zebrafish larvae. *Behav Brain Res*2016; 311: 219–227.
71. Mouchet MA, Bouvier C, Bouvier T, Troussellier M, Escalas A and Mouillot D. Genetic difference but functional similarity among fish gut bacterial communities through molecular and biochemical fingerprints. *FEMS Microbiol Ecol*2012; 79: 568–580.
72. Tims S, Zoetendal EG, de Vos WM and Kleerebezem M. Host genotype and the effect on microbial communities. In: Nelson KE (ed.) *Metagenomics of the human body*. Berlin: Springer, 2011, pp. 15–41.
73. Festing MW. Inbred strains should replace outbred stocks in toxicology, safety testing, and drug development. *Toxicol Pathol*2010; 38: 681–690.
74. Hufeldt MR, Nielsen DS, Vogensen FK, Midtvedt T and Hansen AK. Variation in the gut microbiota of laboratory mice is related to both genetic and environmental factors. *Comp Med*2010; 60: 336–342.
75. Millot S, Péan S, Labbé L, et al. Assessment of genetic variability of fish personality traits using rainbow trout isogenic lines. *Behav Genet*2014; 44: 383–393.
76. Bongers AB, Sukkel M, Gort G, Komen J and Richter CJ. Development and use of genetically uniform strains of common carp in experimental animal research. *Lab Anim*1998; 32: 349–363.
77. Grimholt U, Johansen R and Smith AJ. A review of the need and possible uses for genetically standardized Atlantic salmon (*Salmo salar*) in research. *Lab Anim* 2009; 43: 121–126.
78. Pham LN, Kanther M, Semova I and Rawls JF. Methods for generating and colonizing gnotobiotic zebrafish. *Nat Protoc*2008; 3: 1862–1875.
79. Becker N, Kunath J, Loh G and Blaut M. Human intestinal microbiota: characterization of a simplified and stable gnotobiotic rat model. *Gut Microbes* 2011; 2: 25–33.
80. Marques A, Ollevier F, Verstraete W, Sorgeloos P and Bossier P. Gnotobiotically grown aquatic animals: opportunities to investigate host–microbe interactions. *J Appl Microbiol*2006; 100: 903–918.
81. Nicklas W, Keubler L and Bleich A. Maintaining and monitoring the defined microbiota status of gnotobiotic rodents. *ILAR J*2015; 56: 241–249.
82. Ericsson AC and Franklin CL. Manipulating the gut microbiota: methods and challenges. *ILAR J* 2015; 56: 205–217.
83. Henriksen MMM, Madsen L and Dalsgaard I. Effect of hydrogen peroxide on immersion challenge of rainbow trout fry with *Flavobacterium psychrophilum*. *PLoS One* 2013; 8: e62590.
84. Van der Staay FJ, Arndt SS and Nordquist RE. The standardization–generalization dilemma: a way out. *Genes Brain Behav*2010; 9: 849–855.
85. Richter SH, Garner JP and Würbel H. Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments? *Nat Methods*2009; 6: 257–261.
86. Nicklas W. International harmonization of health monitoring. *ILAR J*2008; 49: 338–346.
87. Johansen R, Needham JR, Colquhoun DJ, Poppe TT and Smith AJ. Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *Lab Anim* 2006; 40: 323–340.
88. Eberl G. Addressing the experimental variability associated with the microbiota. *Mucosal Immunol* 2015; 8: 487–490.
89. Hiergeist A, Gläsner J, Reischl U and Gessner A. Analyses of intestinal microbiota: culture versus sequencing. *ILAR J*2015; 56: 228–240.
90. Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, Fournier PE, La Scola B and Raoult D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin Microbiol Rev*2015; 28: 237–264.

Resumen

No se ha prestado mucha atención a los efectos de las microbiotas de peces en la reproductibilidad y comparabilidad de estudios sobre peces hasta la fecha. Factores extrínsecos e intrínsecos, como la calidad del agua, las poblaciones microbianas ambientales, dieta, perfil genético huésped, sexo, edad y estado de estrés, afectan las microbiotas de peces y crean variantes inter e intraespecies significativas. Las microbiotas de peces tienen una función crítica en muchos aspectos clave de la fisiología del huésped, como protección contra patógenos, digestión y desarrollo del tracto digestivo y el sistema inmune local. Por ello, se debería invertir más esfuerzo en la estandarización de los perfiles microbiológicos de los peces de investigación. En este contexto, los temas a considerar incluyen el establecimiento de líneas de peces isobióticas e isogénicas, la estandarización de condiciones de crianza y el desarrollo de pruebas apropiadas para describir adecuadamente las poblaciones microbianas. Existen muchos retos en cada uno de estos temas, y la comunidad de investigadores debe decidir qué aspectos deberían estandarizarse para cada especie y cada tipo de investigación. Para todos los estudios en los que se espera que la microbiota ejerza una influencia, será primordial llevar a cabo unos informes exhaustivos. Cada paso hacia la estandarización aumenta la calidad de los estudios y simultáneamente contribuye a reducir el número de peces utilizados en las investigaciones, lo cual es una obligación ética y legal.